



Amélioration des résultats de la thérapie cellulaire hépatique : Développement d'une nouvelle méthode de préparation du foie receveur et développement d'une source cellulaire alternative aux hépatocytes

Guillaume Pourcher

► To cite this version:

Guillaume Pourcher. Amélioration des résultats de la thérapie cellulaire hépatique : Développement d'une nouvelle méthode de préparation du foie receveur et développement d'une source cellulaire alternative aux hépatocytes. Chirurgie. Université Paris Saclay (COMUE), 2015. Français. NNT : 2015SACLS273 . tel-01278706

HAL Id: tel-01278706

<https://theses.hal.science/tel-01278706>

Submitted on 24 Feb 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° NNT : 2015SACLSZ73

U119: Physiopathogénèse et Maladies du foie



Ecole Doctorale ED 425 : Thérapeutiques innovantes, du fondamental à l'application

DOCTORAT en Sciences *présenté par*

Guillaume POURCHER

Soutenue le 14 décembre 2015

**Amélioration des résultats de la thérapie cellulaire hépatique :
Développement d'une nouvelle méthode de préparation du foie receveur et
développement d'une source cellulaire alternative aux hépatocytes**

JURY :

Président : Professeur Dominique FRANCO (Académie de chirurgie)

Rapporteur : Docteur Anne CORLU (Université des sciences de Rennes 1)

Rapporteur : Professeur Robert CAIAZZO (Université de Lille 2)

Examineur : Professeur Olivier SCATTON (Université Pierre et Marie Curie)

Directeur de thèse : Professeur Ibrahim DAGHER (Université Paris Sud)

Co-Directrice de thèse : Docteur Anne DUBART-KUPPERSCHMITT (Université Paris Sud)

REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse n'aurait pu être mené à son terme sans l'aide de nombreuses personnes, qui tout au long de ces années ont oeuvré pour que tout se déroule dans les meilleures conditions.

Mais avant toute chose je voudrais citer ces vers de JB. Poquelin (Molière) qui me sont chers:

*« Ceux de qui la conduite offre le plus à rire,
Sont toujours sur autrui les premiers à médire »*

En premier lieu, j'aimerais remercier

Le **Professeur Dominique Franco** pour m'avoir permis de devenir chirurgien viscéral, en m'ouvrant la porte de son service, de son équipe de recherche et pour ses précieux conseils de chirurgien hors norme et de chercheur éclairé.

Le **Professeur Ibrahim Dagher**, pour m'avoir guidé comme un frère durant mes années de post-internat. En plus d'être mon directeur de thèse, il est pour moi un modèle chirurgical.

Le **Docteur Anne Dubart-Kupperschmitt**, qui m'a accueilli dans son laboratoire et donné tous les moyens nécessaires pour faire aboutir ce projet de recherche malgré les difficultés. Elle a toujours été infailible et sera toujours présente dans mes pensées par son humanisme et ses bons conseils.

Le **Docteur Anne Corlu** d'avoir accepté d'être mon rapporteur. Mon parcours original nous a fait nous croiser au début de mon internat de gynécologue accoucheur, elle m'a vu évoluer depuis de nombreuses années toujours avec un oeil bienveillant.

Le **Professeur Robert Caiazzo**, qui a accepté d'être rapporteur de mon travail. Avec le **Professeur Francois Pattou**, ils représentent, interprètent et vivent avec passion, tous mes idéaux de chirurgien chercheur. Suis très fier de faire parti de leurs amis.

Le **Professeur Olivier Scatton** d'avoir accepté d'être mon examinateur mais surtout pour son amitié.

Le **Professeur Sylvie Naveau**, elle a été déterminante dans ma carrière car j'ai eu l'honneur de développer sous sa direction une filiaire de soins autour de la maladie obésité.

Le **Docteur Anne Weber**, pour ses commentaires judicieux.

Madame Marie-Thérèse Groyer-Picard, pour son aide inestimable, sa disponibilité, sa patience, sa gentillesse et son amitié.

Le **Docteur Frédéric Kanso**, pour m'avoir accompagné durant son année de master, mais aussi son aide précieuse, son amitié et sa compétence sans quoi ce travail n'aurait pas pu prendre forme.

Mademoiselle Hoda El-Kehdy pour avoir pu conjuguer nos forces et pour sa ténacité. Elle a permis par sa collaboration la réalisation de ce travail.

Monsieur Olivier Trassard qui s'est investi avec passion dans ce projet, grâce lui de nouvelles technologies ont pu être évaluées et enrichir ce travail de thèse.

Madame Nathalie Ba pour sa collaboration sans faille.

Monsieur Istvan Blazsek pour son aide et ses conseils de chercheur éclairé.

Monsieur Arnaud POUILLY (PULSION Medical Systems AG) pour sa disponibilité et la mise à disposition son matériel et de son savoir faire.

Mes chers collègues de l'unité INSERM 972, **Jean-Jacques, Clara, Martin, Eléa, Itzvan, Jonathan, Marcelin, Sylvie, Noushin, Zahia, Cécile, Sonia, Marie, Karim, Rémi, Seb, Yousra, Moly et Wenwei** sans qui ces années laborieuses n'auraient pas eu la même saveur.

Mes chers collègues chirurgiens du service de chirurgie digestive minimale invasive, **Emmanuel, Dimitri, Niaz, Stefano, Martin, Panos, Giuseppe, Hadrien et Fajer** qui m'ont permis de réaliser ce travail en parallèle de mon activité chirurgicale.

Toute l'équipe (infirmières, aide soignants, diététiciennes, psychologues, cadres...) du service de chirurgie digestive minimale invasive qui m'ont toujours soutenu.

L'association des Poids plumes et plus particulièrement **Claudine**, pour leur dynamisme et leur amitié sans faille.

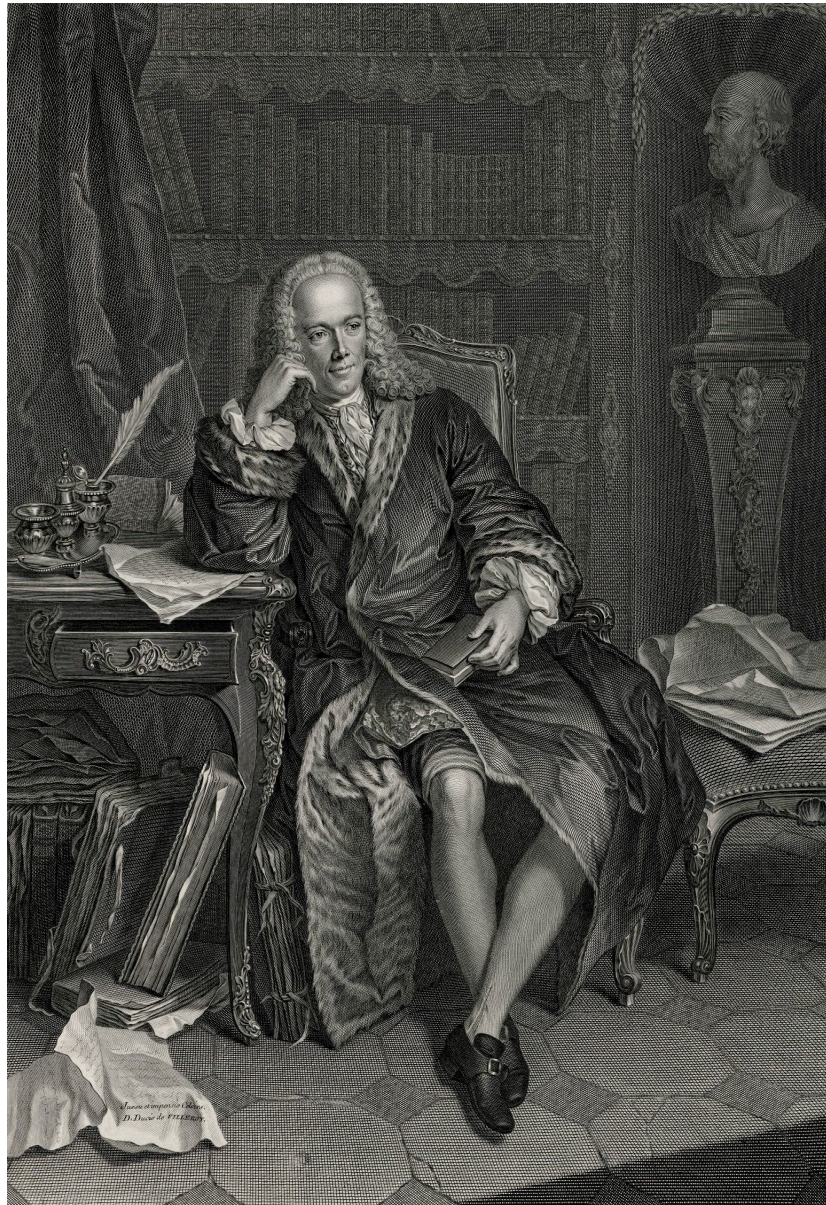
L'équipe de la faculté de médecine Paris-sud et de l'Ecole doctorale ED425, tout particulièrement **Madame Lucy Landry** et le **Professeur Marc Paillard** pour leur bienveillance.

L'Association NRB (Nouvelles Recherches Biomédicales) pour son aide précieuse grâce à la bourse qu'elle m'a accordée pour l'année de recherche à temps plein (2011-2012) dans l'unité INSERM U972.

Le **laboratoire Biopredic** et plus particulièrement **Christophe Chéné**, pour leur aide depuis mon internat.

Mes chers parents, mon épouse Valérie sans qui je n'aurais pas pu aller jusqu'au bout de ce travail, **nos 3 enfants et mes frères** que j'aime tant. Ils ont su m'accompagner de tout leur amour.

Monsieur Francois Quesnay (1694 - 1774), illustre secrétaire perpétuel de l'Académie Royale de chirurgie, initiateur de la physiocratie, encyclopédiste, chirurgien et médecin du Roi Louis XV. Il sera toujours pour moi, par sa vie exemplaire, son humanisme, sa douceur, son esprit innovant, révolutionnaire, et par notre parenté, un modèle absolu.



« Propter Cogitationem Mentis » (Comme les pensées de votre esprit)

Portrait de François Quesnay réalisé par Jean-Charles François,

D'après une peinture de Jean-Martial Frédou (1779)

Table des matières

ABBREVIATIONS.....

1 INTRODUCTION.....

1.1 Anatomie et bases de la physiologie hépatique

1.1.1 Organogenèse hépatique

- Induction hépatique
- Formation du bourgeon hépatique
- Importance de la matrice extra-cellulaire
- Signaux émanant des cellules endothéliales
- Croissance du bourgeon hépatique
- Rappel sur le foie fœtal

1.1.2 Situation anatomique et segmentation

- Chez l'homme
- Chez la souris

1.1.3 Structures et composition cellulaire du foie

- Fonctions hépatiques
- Types cellulaires
- Le lobule hépatique

1.1.4 Rôles et répartition des fonctions hépatiques

1.2 Insuffisance hépatique et cirrhose

1.3 Les maladies métaboliques du foie

1.4 Quels traitements disponibles aujourd'hui pour ces pathologies?

1.4.1 Traitement symptomatique

1.4.2 La transplantation d'organe

1.4.3 Les foies artificiels et organoïdes hépatiques

- Le foie artificiel
- Le foie bio-artificiel
- Autres approches

1.4.4 La transplantation d'hépatocytes

1.5 La régénération hépatique

1.5.1 Définition

1.5.2 Mécanismes régénératifs du foie sain

1.5.3 Mécanismes régénératifs du foie malade

1.5.4 Marqueur cellulaire de régénération : Ki67

1.6 Pourquoi la transplantation d'hépatocytes?

1.6.1 Généralités

1.6.2 Historique

1.6.3 Thérapie génique

1.6.4 Quelles en sont les indications ?

1.6.5 État des lieux

1.7 Comment améliorer la prise de greffe

1.7.1 Qualité des cellules greffées

1.7.2 Type de cellules disponibles pour la transplantation

1.7.2.1 Hépatocytes adultes

1.7.2.2 Les hépatoblastes

1.7.2.3 Les cellules ovales

1.7.2.4 Les cellules souches hépatiques de l'arbre biliaire (hBTSCs)

1.7.2.5 Les cellules souches embryonnaires humaines (hESC)

1.7.2.6 Les cellules souches pluripotentes induites humaines (hiPSC)

1.7.2.7 Les cellules souches somatiques

- **Cellules souches hématopoïétiques**
- **Cellules souches mésenchymateuses (CSM)**
- **CSM de foie fœtal humain**
- **Conversion directe de fibroblastes en cellules "hepatocyte-like"**

1.7.3 Optimiser le site d'injection

1.7.4 La préparation du foie receveur

1.7.4.1 Chimiothérapie et autres toxiques

➤ Régénération après destruction hépatique

➤ Régénération par hyperplasie compensatoire directe

1.7.4.2 Génotoxicité du foie receveur

1.7.4.3 Radiothérapie

1.7.4.4 Hépatectomie partielle

1.7.4.5 Ligature et embolisation portales sectorielles

➤ La ligature portale sectorielle

➤ L'embolisation portale sectorielle

1.7.5 Traitements adjuvants

1.7.5.1 Facteurs de croissance

1.7.5.2 Vasodilatateurs et autres

2 OBJECTIF DU TRAVAIL DE THESE.....

2.1 Optimiser la preparation hépatique dans un modèle préclinique

= Nouveau concept de l'embolisation portale volumétrique (EPV)

2.2 Evaluation du potentiel de différenciation hépatique des MSC fœtales humaines

3	MATERIEL, METHODES ET RESULTATS.....
4	ARTICLES DE THÈSE ET AUTRES TRAVAUX.....
5	DISCUSSION.....
6	CONCLUSION.....
7	REFERENCES.....
8	ANNEXES.....

ABBREVIATIONS

A1AT : α 1-antitrypsine
ABCG2: ATP-binding cassette sub-family G member 2
ADHLC: adult-derived human liver mesenchymal-like cells
AFP: alpha-fœto protéine
ALK4: activin receptor-like kinase 4
APC: adenomatous polyposis coli
ARF : ADP ribosylation factor
ASGPR: asialoglycoprotein receptor
BMP: bone morphogenetic protein
CD: cluster of differentiation
C/EBP: CCAAT-enhancer binding protein
CDX: caudal type homeobox transcription factor
CMI : les cellules de la masse interne du blastocyste
CK : cytokératine
CSH : cellules souches hématopoïétiques
DDC : 3,5-diethoxycarbonyl-1-4dihydrocollidine
DNMT3B : DNA (cytosine-5-)-méthyltransferase 3 beta
DPPA : developmental pluripotency-associated protein
DPPIV: dipeptidyl peptidase IV
EGF: epidermal growth factor
ELF: E74-like factor
EpCAM: epithelial specific cell adhesion molecule
FAH: fumaryl acetoacetate hydrolase
FGF: fibroblast growth Factor
FL-CSM: fetal liver CSM
FOX: forkhead box
GATA : facteurs de transcription capables de se lier à la séquence ADN “GATA”
G6Pase: glucose-6-phosphatase
GDF3: growth differentiation factor-3
GFP: green fluorescent protein
GGT: γ -glutamyl-transpeptidase
GPI: glycosylated phosphatidyl inositol
GS: glutamine synthétase
GSC : Facteur de transcription goosecoïde
hBTSCs : cellules souches humaines de l’arbre biliaire
HC : hydrates de carbone
HepPar1 : hepatocyte paraffin 1
hFLMPC: human fetal liver multipotent progenitor cell
HGF: hepatocyte growth factor
HHEX: hematopoietically expressed homeobox
hiPSC : cellules souches pluripotentes induites humaines
HNF: hepatocyte nuclear factor, facteur de transcription hépatique
HP : hépatectomie partielle
hTERT: telomerase reverse transcriptase humaine
ICAM-1: inter-cellular adhesion molecule 1
IHA : Insuffisance hépato-cellulaire aigue
IL: interleukine
INR : International Normalized Ratio

IRD : Infantile Refsum Disease
JPC : jour post-conception
KLF4: kruppel-like factor 4
K-RAS: kristen rat sarcoma oncogene
LDL: low-density lipoprotein
LRH: liver receptor homolog
MARS: molecular adsorbant recirculation system (foie bioartificiel externe)
MEC : matrice extracellulaire
MIXL1 : Mix1 homeobox-like 1
MMHH : maladies métaboliques héréditaires hépatiques
MMP: matrix metalloproteases
MSC: mesenchymal stem cells
NF1: nuclear factor 1
NFκB: nuclear factor-kappa B
OCT4: octamer-binding transcription factor 4
OSM: oncostatine M
OTC: ornithine transcarbamylase
PAH: phenylalanine hydroxylase
PDGF: platelet-derived growth factor
PDX1: pancreatic and duodenal homeobox 1
PEPCK: phosphoénolpyruvate carboxykinase
PPIA: peptidylprolyl isomerase A
PROX1: prospero related homeobox protéine 1
RAG: recombination activating gene
SOX: SRY (sex determining region Y)-box
SPAD: single pass albumin dialysis
SSEA: stage specific embryonic antigen
SCF: stem cell factor
SCNT: somatic cell nuclear transfert
TAT : tyrosine aminotransferase
TH : Transplantation hépatique
TP : taux de prothrombine
TBX3 : T-Box transcription factor 3
TGF-β: transforming growth factor beta
TNF-α: tumor necrosis factor
TRA1: tumor rejection antigen 1
uPA: enzyme urokinase plasminogène A
U. S: United States
VHB: virus de l'hépatite B
WNT: wingless-type MMTV integration site family
WT1: Wilm's tumor supressor
XBP1: X-box binding protein 1

INTRODUCTION

« Un désordre de fonctions suppose une lésion matérielle », tel fut le point de départ de Monsieur Broussais au crépuscule du premier Empire. Cet homme de génie, médecin, chirurgien, s'emparant de l'anatomopathologie, s'en servit pour ébranler la science et la jeter dans de nouvelles voies en développant ses thèses de relations entre « vie » et « stimulus » tout en les intégrant dans l'interdépendance (ou « sympathies ») des divers organes [1]. C'est dans cette « philosophie » que ce travail essaie de mettre en évidence les futures possibilités de thérapie cellulaire en cas d'insuffisance de la fonction hépatique.

1.1. Anatomie et bases de la physiologie hépatique

« Le foie exerce la sagacité des anatomistes depuis plusieurs siècles et telles sont cependant les difficultés dont s'entoure son étude, que tant d'efforts réunis semblent n'avoir produit jusqu'à présent qu'un dédale d'opinions contradictoires ». Telle est l'introduction du chapitre sur le foie du traité d'anatomie descriptive de Monsieur Philibert Constant Sappey, chirurgien, professeur d'anatomie à la faculté de médecine de Paris et Président de l'académie de médecine en 1889 [2]. Dès l'an 2000 avant Jésus-Christ, le foie était bien connu des Babyloniens qui associaient déjà des noms aux différentes zones du foie [3]. Les Babyloniens considéraient même le foie comme le siège de l'âme, en raison d'observations de blessures de guerre et de sacrifices animaux au cours desquels des hémorragies massives survenaient à point de départ hépatique.

Le foie est considéré aussi comme le plus volumineux et le plus lourd des viscères. Ses dimensions varient selon l'âge, selon l'individu et selon l'état de santé. Chez l'embryon de trois semaines à trois mois, cet organe est déjà si développé qu'il remplit à lui seul la plus grande partie de l'abdomen [4].

Aujourd'hui le mystère hépatique semble au moins partiellement résolu par le travail de plus d'un siècle de connaissances.

1.1.1. Organogenèse hépatique

Le développement embryonnaire du foie est la conséquence de toutes les interactions entre l'endoderme et le mésoderme [5-7]. Les hépatocytes ainsi que les cholangiocytes, cellules majoritaires du foie adulte, dérivent de l'endoderme tandis que la partie non parenchymateuse comprenant les cellules stromales, les cellules de Kupffer, les cellules étoilées ou encore les cellules endothéliales qui bordent les vaisseaux sanguins dérivent du mésoderme. Plusieurs études menées chez la souris, le poisson zèbre et l'embryon de poulet montrent que les facteurs de transcription qui régulent la transition des cellules progénitrices en cellules matures sont régulés par la variation de la concentration et la chronologie des signaux cellulaires [8, 9]

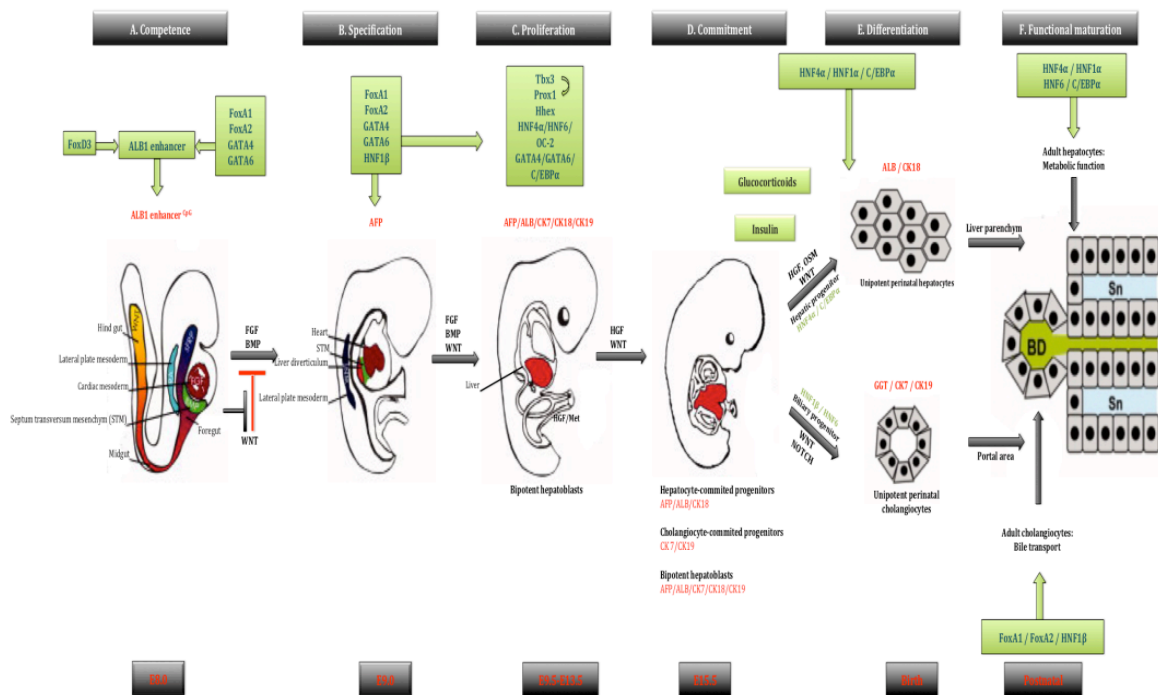


Figure 1. Signaux intra et extra-cellulaires régulant le développement du foie murin *in vivo* [8, 9]

Au cours des différents stades du développement du foie in vivo (gris) et à chaque stade du développement (gris foncé), plusieurs signaux extra-cellulaires (noir) et intra-cellulaires (vert) se mettent en place. L'acquisition des propriétés phénotypiques spécifiques (rouge) résulte de l'exposition aux facteurs de croissance et cytokines hépatogéniques avec la présence de co-facteurs (jaune).

Chronologie des événements du développement du foie in vivo jusqu'à l'obtention d'un organe fonctionnel :

a-Phase de compétence : Avant l'induction de l'endoderme, l'activateur transcriptionnel de l'albumine (alb1 enhancer) est copié sous forme non méthylée et ceci résulte de l'action de FOXD3 et par la suite par FOXA1 et FOXA2 en combinaison avec GATA4 et GATA6. Au cours la formation et la structuration de l'intestin (foregut) autour du 8^{ème} jour post-conception (JPC) l'inhibition de WNT par induit l'acquisition de sa compétence hépatique dans l'endoderme ventral. À ce stade, les FGF (fibroblast growth factor) du mésoderme cardiaque (cardiac mesoderm) et les BMP (bone morphogenetic protein) du septum transversum contribuent également à la compétence hépatique en parallèle avec l'acide rétinoïque de la plaque latérale mésodermique.

b-Phase de spécification : Après la structuration de l'intestin (foregut) au 8^{ème} JPC, la voie de signalisation de WNT se réactive. A ce stade les facteurs de transcription FOXA et GATA ainsi que HNF1 β jouent un rôle important.

c-Phase de prolifération : L'activité de WNT/béta-Caténine en association avec HGF/Met (Met : récepteur transmembranaire du HGF (hepatocyte growth factor)), les FGF et les BMP induisent l'expansion des hépatoblastes bipotents du bourgeon hépatique. Les hépatoblastes bipotents expriment à la fois des marqueurs hépatiques et biliaires. A ce stade, plusieurs facteurs de transcription sont importants pour la prolifération et la migration des hépatoblastes.

d-Phase de détermination : Au alentours du 15^{ème} JPC, on peut distinguer 3 types cellulaires : 1) Des cellules déterminées vers la voie hépatocytaire exprimant uniquement des marqueurs hépatiques 2) Des cellules déterminées vers la voie cholangiocytaire exprimant des marqueurs biliaires 3) Une population d'hépatoblastes bipotents exprimant à la fois des marqueurs hépatiques et biliaires.

e-Phase de différenciation : La différenciation cholangiocytaire est régulée par les voies de signalisation de Notch et WNT en l'absence de l'HGF tandis que la différenciation hépatique dépend de l'HGF et WNT en présence d'insuline. La maturation des hépatocytes fœtaux est induite par l'Oncostatine M (OSM) et les glucocorticoïdes.

f-Phase de maturation fonctionnelle : Après la naissance, les hépatocytes deviennent adultes et fonctionnels sous l'effet de l'HGF sécrété par les cellules environnantes comme les cellules endothéliales et les cellules hépatiques stellaires,

➤ Induction hépatique

L'induction hépatique se déclenche sous l'effet conjoint de FGFs (FGF1 et FGF2) sécrétés par le mésoderme cardiaque et de BMPs (BMP2 et BMP4) provenant du septum transversum [10-12] préparant ainsi l'expression de l'albumine. Une forte exposition entraîne la différenciation en poumon de la zone intestinale destinée à devenir du foie. Les mouvements morphogénétiques sont importants puisque, le septum transversum en se glissant entre le mésoderme cardiaque et l'endoderme permet une diminution de l'exposition de l'endoderme aux FGFs (Figure 1).

➤ Formation du bourgeon hépatique

Les cellules souches hépatiques commencent à exprimer les marqueurs hépatiques comme l'albumine et initient la formation du diverticulum hépatique dès le 22^{ème} jour du développement humain. Ces cellules changent de morphologie, elles passent d'une forme cuboïde à un épithélium stratifié [13]. De même, les cellules du diverticulum, entourées d'une membrane basale riche en laminine, collagène IV, fibronectine, nidogène/entactine et protéoglycanes, [14], migrent au travers de cette membrane pour former le bourgeon hépatique [15-17]. Les cellules ayant migré rentrent en transition épithélio-mésenchymateuse et perdent ainsi l'expression de l'E-cadhérine. De nombreux facteurs de transcription et signaux sécrétés par les cellules endothéliales sont impliqués dans ce processus.

➤ Importance de la matrice extra-cellulaire

Les interactions entre les hépatoblastes, les cellules endothéliales et la matrice extra-cellulaire sont nécessaires pour le bon déroulement de la migration des cellules [18]. Des études suggèrent que les hépatoblastes régulent la composition de la matrice et synthétisent des métalloprotéases matricielles (MMPs) qui permettent la digestion de la matrice [19, 20]. L'inhibition des MMPs bloque la migration des cellules [21]. Ces interactions se font par la sous-unité $\beta 1$ de l'intégrine et la laminine de la matrice. Un déficit en sous-unité $\beta 1$ empêche les cellules de coloniser le septum transversum, et engendre aussi de nombreux défauts de morphogenèse [22].

➤ Signaux émanant des cellules endothéliales

Les progéniteurs endothéliaux se situent entre le septum et les hépatoblastes (Figure 1). Une étude menée chez la souris montre qu'en l'absence de cellules endothéliales, les hépatoblastes ne migraient pas [23]. De plus, une étude menée chez le poulet montre que des inhibiteurs de l'angiogenèse répriment la croissance du bourgeon hépatique *in vitro* ce qui suggère que les cellules endothéliales sécrètent des facteurs paracrines inconnus qui stimuleraient la prolifération et/ou la migration. La neurturine, sécrétée par les vaisseaux sanguins pourrait être un candidat potentiel ayant un pouvoir chimiotactique sur les hépatoblastes [24].

➤ Croissance du bourgeon hépatique

Elle se déroule entre 9 et 15 JPC chez la souris et à partir du 22^{ème} JPC chez l'humain [9], le volume du foie va s'accroître pour atteindre à peu près le quart de la masse de l'embryon de souris. Cette croissance est stimulée par des signaux émanant du mésenchyme hépatique et correspond à la phase de prolifération et de multiplication des hépatoblastes avec la mise en place des mécanismes d'activation et d'inhibition des modulateurs de la prolifération et de l'apoptose. Dans le foie précoce, une mutation de gènes codant pour des facteurs de

transcription ou des cascades de signalisation cause une apoptose importante via notamment K-RAS (Kristen rat sarcoma oncogene) et SERK1 (MKK4/JNKK mitogen activated protein kinase kinase 4) [25]. La présence simultanée d'inducteurs d'apoptose et d'inhibiteurs/régulateurs de ces signaux contribuerait à la morphogenèse du foie.

La détermination des hépatoblastes a lieu au stade fœtal. Les hépatoblastes sont des cellules bipotentes, capables de se différencier en hépatocytes exprimant entre autres HNF4 α , ou en cholangiocytes exprimant notamment CK7 et CK19 (Cytokératines 7 et 19) (Figure 1. Une fois l'hépatoblaste orienté vers le lignage hépatocytaire, sa différenciation sera régulée via des signaux extra-cellulaires spécifiques. Ces signaux proviennent des cellules hématopoïétiques initialement localisées dans le foie fœtal, qui favorisent la maturation des hépatoblastes en sécrétant l'OSM (Oncostatine M) et l'IL-6 (Interleukine 6) [26, 27]. L'OSM, en induisant K-RAS et l'E-Cadhérine permet aux hépatocytes de constituer, au cours de leur maturation, un épithélium polarisé [28, 29]. D'autre part, le TNF- α (Tumor Necrosis Factor) maintient la prolifération des hépatoblastes et par conséquent la croissance du foie [30].

➤ Rappel sur le foie fœtal

Le foie fœtal commence par définition entre 4 et 5 semaines post-conception chez l'homme. C'est un organe transitoire mais important pour l'expansion et la différenciation des cellules souches hématopoïétiques (CSH) chez l'homme comme chez la souris. L'hématopoïèse émerge au niveau de plusieurs sites intra- et extra-embryonnaires [31]. Chez la souris, ce processus démarre par l'hématopoïèse primitive au niveau du sac vitellin où les cellules érythroïdes se forment, suivies de la formation des progéniteurs érythroïdes. Ces derniers migrent dans le foie fœtal [32-35]. Chez l'homme, l'hématopoïèse primitive démarre dans le sac vitellin à 17 JPC, suivant deux étapes de colonisation du foie à 23 et à 30 JPC [36]. Dans le foie fœtal, l'hématopoïèse est détectée à 10 JPC chez la souris et durant la cinquième semaine de gestation

chez l'homme. Ce dernier devient le site prédominant de l'hématopoïèse à partir de 11 JPC chez la souris et de la quinzième semaine de gestation chez l'homme. Avant la naissance chez l'homme et autour de la naissance chez la souris, les cellules souches hématopoïétiques quittent le foie pour coloniser la moelle osseuse [37]. Entre 12,5 et 16,5 JPC, les CSH du foie fœtal s'auto-renouvellent et se différencient en grande quantité en progéniteurs hématopoïétiques [38-40] (Figure 2).

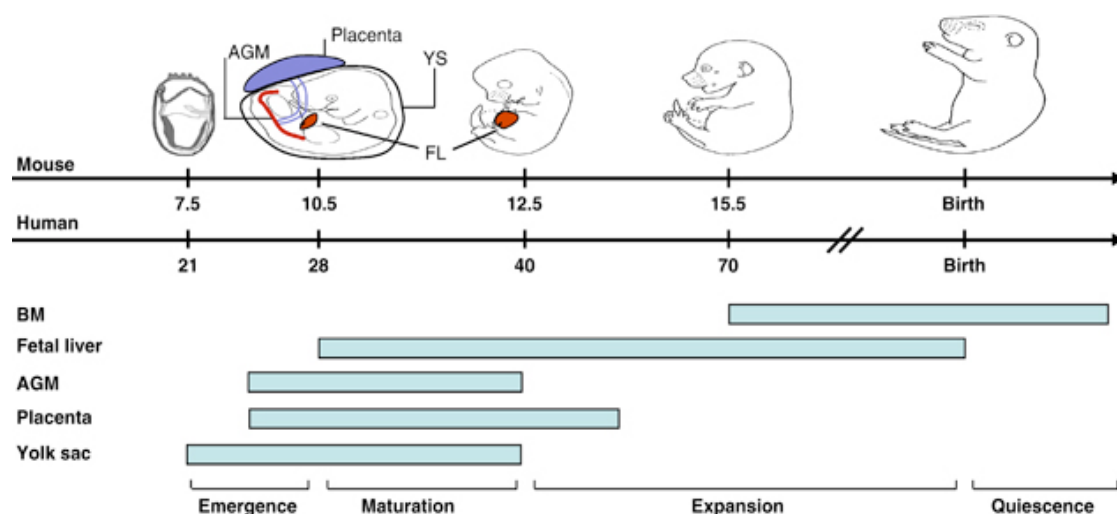


Figure 2 : L'hématopoïèse au cours du développement fœtal, d'après Luis et al., Leukemia, 2012 [41]. Les rectangles présentent l'âge auquel les sites hématopoïétiques sont actifs chez la souris et l'homme.

L'hématopoïèse dans le foie fœtal est régulée par des facteurs intrinsèques (programmés par l'expression de certains gènes) et extrinsèques (contrôlés par les cellules qui entourent les CSH) [34]. Les cellules impliquées dans la régulation extrinsèque sont les hépatoblastes, les cellules endothéliales sinusoïdales du foie et les cellules stromales. Les cellules stromales du foie fœtal sont définies comme étant des cellules à caractéristique épithélio-mésenchymateuses capables de soutenir l'hématopoïèse durant la période de gestation. Cependant, cette capacité est perdue

au cours de la maturation du foie lorsque les cellules stromales sont remplacées par les hépatocytes [42]. La co-culture des cellules souches hématopoïétiques avec les cellules stromales du foie fœtal favorise l'expansion et la différenciation suivant des mécanismes encore inconnus [37, 43]. Le foie fœtal est le site principal d'expansion et de différenciation des CSH avant leur migration vers la moelle osseuse [44].

1.1.2. Situation anatomique et segmentation

Le foie est caractérisé par sa situation fonctionnelle particulière. En effet il est placé entre le tube digestif et le reste de l'organisme c'est-à-dire entre l'extérieur et le soi. Il joue donc un rôle de « douane » pour contrôler toutes les molécules absorbées lors de leur « premier passage ». Pour assurer cette fonction, la totalité du sang issu du tube digestif est drainé par le système porte (la veine porte) qui assure 75% du débit sanguin hépatique afférent. Le sang artériel oxygéné arrive au foie par l'artère hépatique (25% du débit). Les molécules faisant l'objet d'un premier passage sont généralement des xénobiotiques (molécules étrangères à l'organisme) mais également des substances physiologiques comme les sels biliaires. Certaines molécules très lipophiles, comme certains lipides, échappent à l'effet de premier passage en passant par le circuit lymphatique.

Cet organe pèse environ 2500 g chez le vivant et ses dimensions sont proportionnellement plus importante chez le nouveau-né et le jeune enfant que chez l'adulte [45]. Le foie est constitué d'un parenchyme friable dont les cellules se groupent en lobules hépatiques entre et à l'intérieur desquels se ramifient les branches des artères hépatiques, de la veine porte, des canaux biliaires intra-hépatiques qui drainent la bile et des veines sus-hépatiques qui drainent le sang hépatique efférent vers la veine cave. L'ensemble est entouré par une capsule fibreuse, la capsule de Glisson, et est suspendu par des ligaments comme décrit dans les figures 3 et 4.

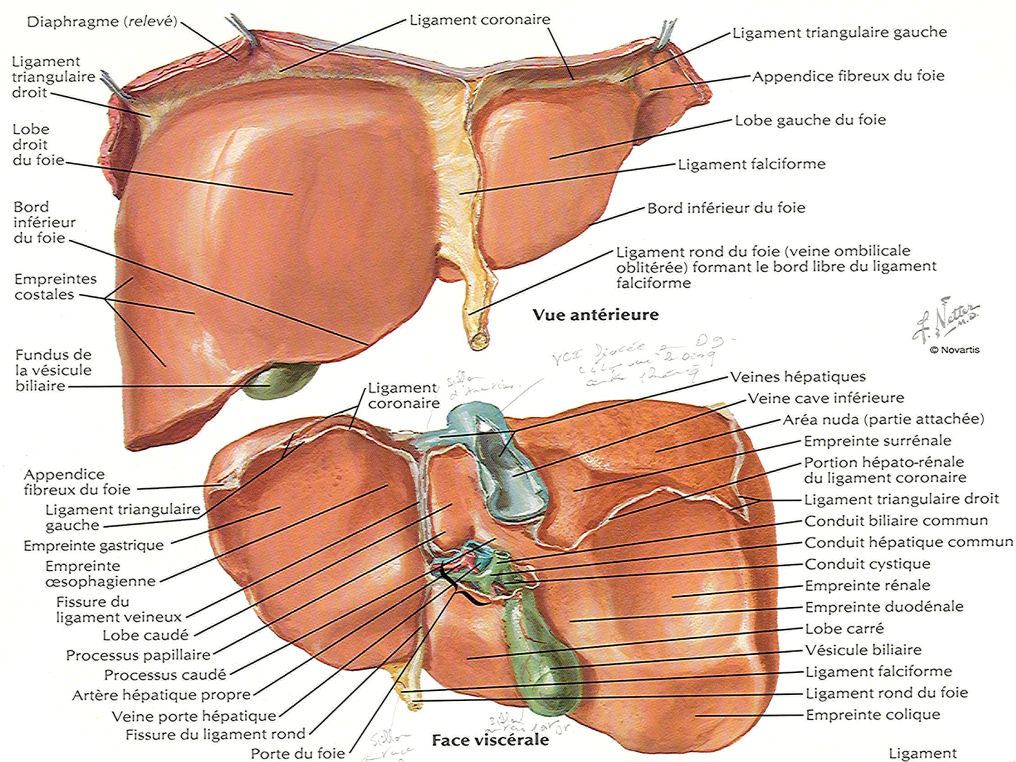


Figure 3: Anatomie macroscopique du foie humain d'après Netter en vue antérieure et inférieure [4].

➤ Chez l'homme

Le lobule hépatique est lui-même limité par des espaces conjonctifs, dépendant de la gaine glissonienne [45]. Le lobule hépatique est défini par la présence en son centre d'une veine centro-lobulaire, qui est un afférent des veines sus-hépatiques, et en périphérie des espaces portes comprenant une branche de la veine porte, une branche artérielle et un canal biliaire. Entre les veines inter-lobulaires, périphériques et la veine centro-lobulaire s'interpose un réseau de capillaires sinusoides radiés au contact desquels se disposent les hépatocytes.

La notion de segmentation hépatique est récente. Pendant longtemps, le foie a été considéré comme un organe homogène, une masse de parenchyme compact pratiquement indissociable. Certes la présence à la surface de sillons ou d'insertions ligamentaires avait permis de lui décrire un certain nombre de lobes. Cette division purement morphologique, d'ailleurs

controversée et variable selon les auteurs [2, 45, 46] ne correspondait à aucune réalité fonctionnelle, à aucun territoire parenchymateux précis. Ainsi la segmentation hépatique telle qu'on la conçoit actuellement est une segmentation fonctionnelle, analogue à la segmentation pulmonaire et basée sur la notion de territoire vasculaire (figure 4 et 5) [4].

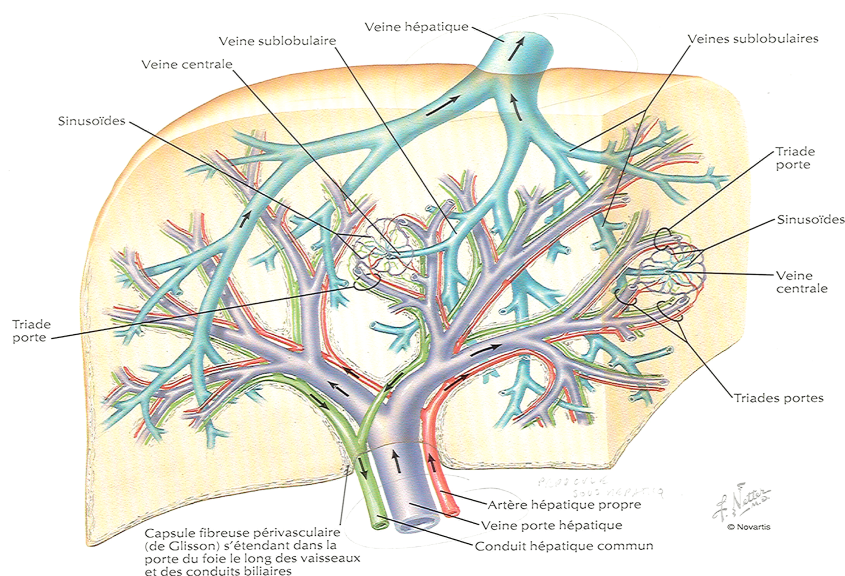


Figure 4: Schéma représentant la répartition vasculaire terminale et proximale du foie, base des segmentations portale et sus-hépatique [4].

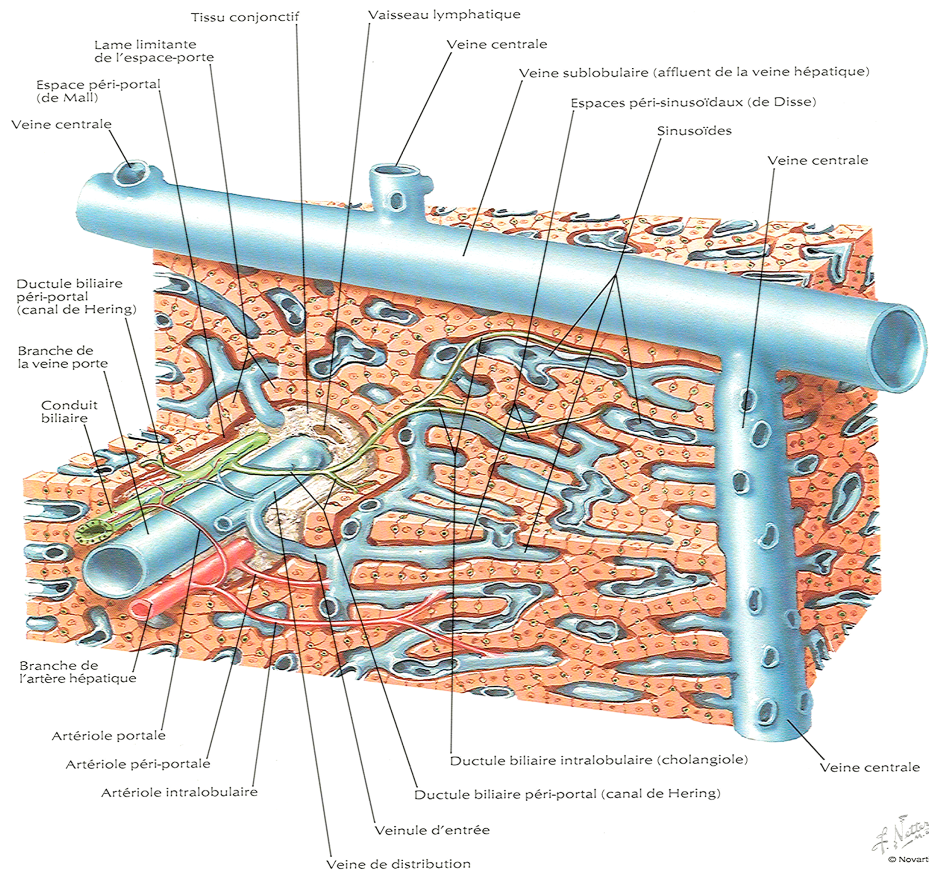


Figure 5: Reconstruction anatomique du parenchyme hépatique distal et de la microcirculation hépatique avec les deux circulations veineuses [4] ;

Il existe de ce fait deux segmentations du foie :

- **La segmentation portale**, basée sur la distribution du pédicule glissonien c'est-à-dire les ramifications portales, artérielles et biliaires qui suivent à l'intérieur du parenchyme un trajet commun. La segmentation portale a été décrite par Couineau [47] (figure 6 et 7). Le tronc portal se divisant à son entrée dans le hile hépatique, on distingue un foie gauche et un foie droit. En effet, dès leur entrée dans le hile hépatique, ces ramifications s'entourent d'une mince gaine conjonctive issue de la capsule glissonienne d'où le nom de pédicule glissonien [45]. Il faut d'ailleurs noter qu'à l'intérieur de chaque pédicule glissonien, les rameaux biliaires sont toujours en situation épiportale c'est-à-dire que ce sont eux que l'on trouve toujours en premier lors de la dissection du pédicule, ce qui est une notion importante d'un point de vue chirurgical.

- **La segmentation sus-hépatique**, est beaucoup plus simple car seules trois veines la composent définissant trois secteurs: le secteur sus-hépatique droit, le secteur sus-hépatique gauche et le secteur sus-hépatique médian.

Chacun de ces deux territoires vasculaires (portal et sus-hépatique) étant enchevêtrés et disposés en miroir avec entre chaque segment des scissures (portale ou sus-hépatique). Ainsi les branches portales circulent dans les sillons sus-hépatiques et vice et versa.

Cette organisation vasculaire terminale va être la base anatomique de ce travail de thèse.

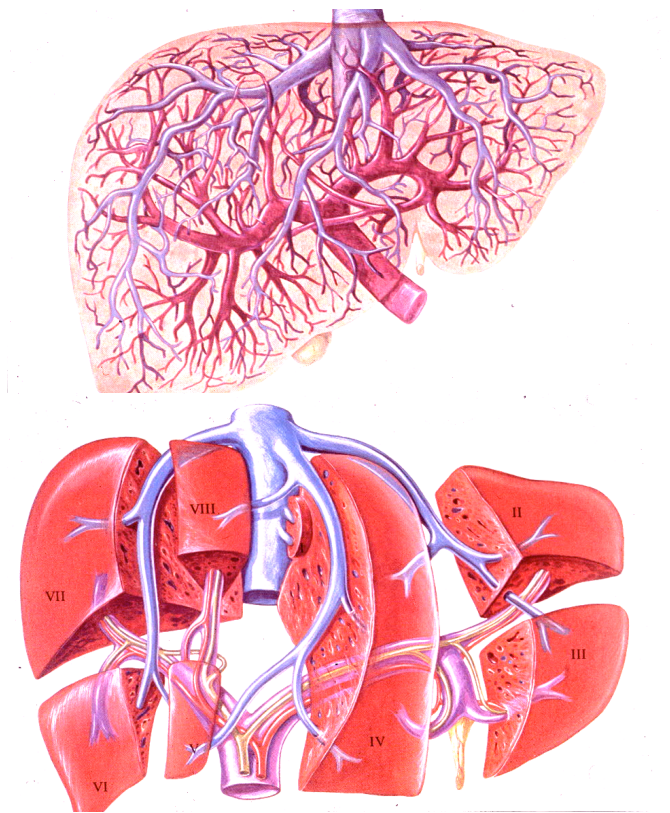


Figure 6: Segmentation hépatique et anatomie macroscopique du foie selon les travaux de Couinaud [4, 47]

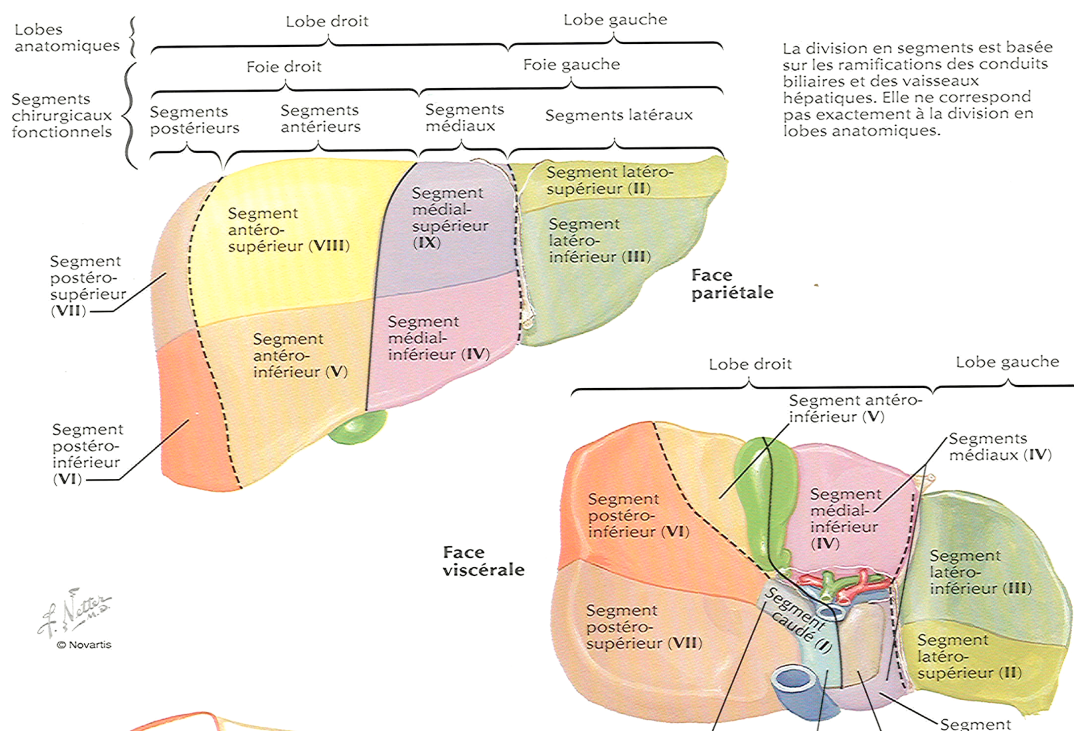


Figure 7: Segmentation hépatique schématisée correspondant aux segments portes et représentant les différentes entités lobaires anatomiques du foie [4].

Ainsi la segmentation hépatique, support anatomique des fonctions métaboliques du foie, organisée sur les divisions portales, permet une obstruction vasculaire ou embolisation segmentaire du foie. Ce principe n'a été jusqu'à présent développé que dans les modèles segmentaires c'est-à-dire l'embolisation d'une partie anatomique du foie (qui doit être réséqué pour des raisons carcinologiques par exemple) afin de déclencher la régénération hépatique dans le foie non embolisé. Ce type d'approche avec préparation du foie restant est réalisée avant une résection hépatique majeure (hépatectomie emportant au moins trois segments contigus), ce qui évite les situations d'insuffisance hépatocellulaire post-opératoire [48].

Cette stratégie est actuellement très largement utilisée en chirurgie hépatique dans le cadre de la maladie métastatique notamment en prévision d'une résection hépatique majeure. L'embolisation pré-opératoire du lobe ou des segments devant être réséqués permettant d'hypertrophier le futur

foie restant (figure 8). Cette approche reste difficilement applicable en clinique dans le cadre d'un programme de transplantation d'hépatocytes.

Nous avons étudié durant ce travail l'intérêt d'une embolisation globale et plus distale pour préserver un maximum de parenchyme hépatique et de vaisseaux fonctionnels.

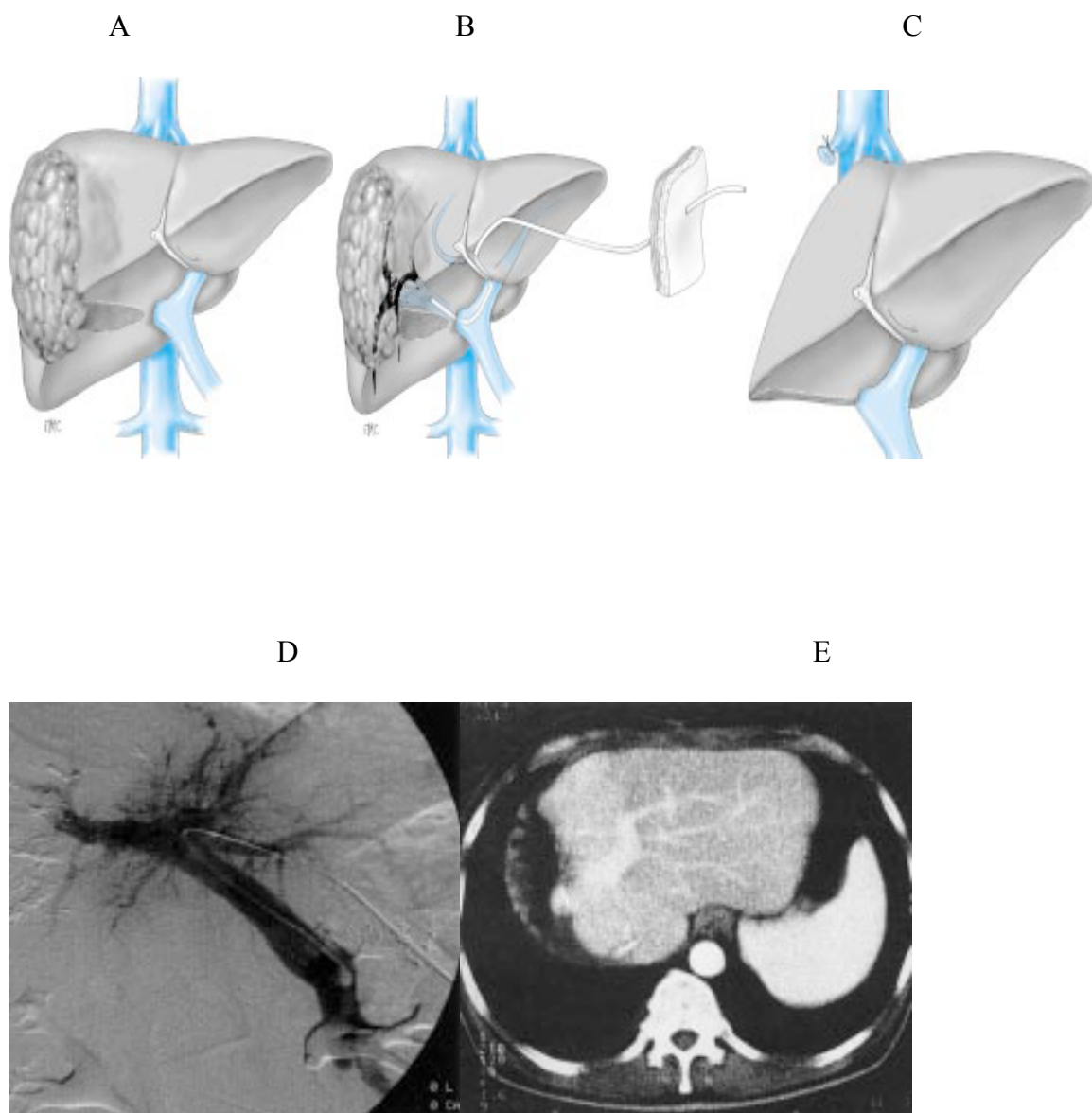


Figure 8 : A et B : Représentation schématique d'une embolisation portale droite anatomique pour tumeur hépatique en prévision d'une hépatectomie droite pour stimuler le foie gauche et provoquer une hypertrophie. C : représentation après la chirurgie avec hépatectomie droite et

hypertrophie du foie gauche. Cette stratégie incluant une embolisation portale pour rendre résécable une métastase volumineuse. D : représente la procédure d'embolisation portale. Les branches droites de la veine porte sont occluses. E : représente le scanner de contrôle après hépatectomie droite montrant les segments restants hypertrophiés [49].

➤ Chez la souris

Le foie de souris présente les mêmes caractéristiques fonctionnelles et métaboliques que le foie humain. Son anatomie diffère par la présence de 4 lobes distincts : lobe gauche, lobe droit, lobe médian et lobe caudal (figure 9). Le foie murin, à la différence du foie humain est donc anatomiquement plurilobé: celui d'un rat adulte pèse de 15 à 20 g, contre environ 3 à 5 g chez la souris (soit environ 4,5% de la masse corporelle chez les muridés et 2,5% chez l'homme) [50].

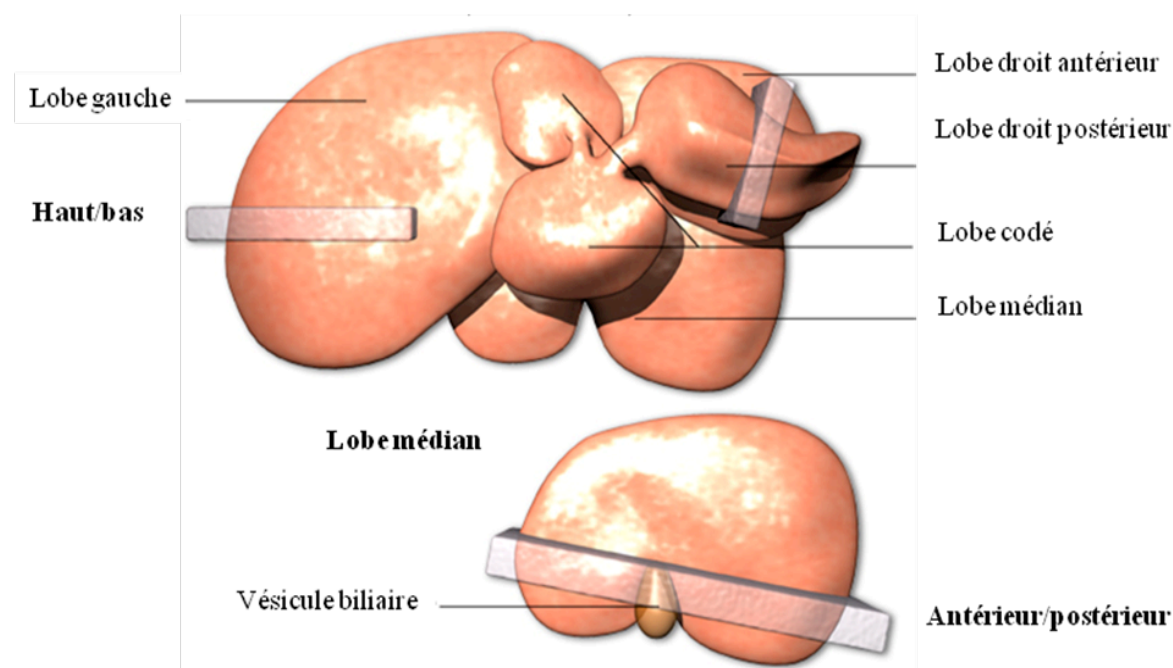


Figure 9 : Représentation d'un foie de souris avec une vue inférieure et antérieure [51].

1.1.3. Structures et composition cellulaire du foie [52]

Le foie adulte contribue par les multiples fonctions qu'il assure, au maintien de l'homéostasie de l'organisme. Le foie est le site de synthèse de diverses molécules essentielles, d'extraction et de métabolisation de nombreux nutriments ou xénobiotiques introduits dans l'organisme notamment via le système digestif.

➤ Fonctions hépatiques

Ses principales fonctions pouvant être résumées ainsi (tableau 1):

- Métabolisme des graisses: oxydation des triglicérides pour produire de l'énergie, synthèse de lipoprotéines plasmatiques, synthèse du cholestérol et de phospholipides
- Métabolisme des hydrates de carbone (HC): conversion des HC et des protéines en acides gras et en triglycérides, régulation de la glycémie par la glycogénèse, la glycolyse et la néoglycogénèse
- Métabolisme protéique: synthèse de protéines plasmatiques comme certains facteurs de coagulation, synthèse d'acides aminés non essentiels, détoxification des déchets métaboliques comme la désamination des acides aminés et la production d'urée
- Stockage: du glycogène, de vitamines, du fer
- Métabolisme intermédiaire: détoxification de médicaments et de toxiques variés comme l'alcool
- Sécrétion: synthèse et sécrétion de la bile.

Tableau 1: Fonctions métaboliques du foie.

Fonctions	Mécanismes
Homéostasie de la glycémie	Néoglucogenèse (Synthèse du glucose à partir de certains acides aminés, lactate ou du glycérol) Glycogénolyse (Production de glucose à partir de la phosphorylase du glycogène) Glycogenèse (Synthèse du glycogène à partir du glucose)
Métabolisme des protéines	Synthèse des acides aminés Synthèse et dégradation des protéines
Synthèse de lipides	Synthèse du cholestérol Lipogenèse, synthèse des triglycérides
Bile	Production et excrétion de la bile nécessaire pour l'émulsification des lipides
Hormone	Synthèse de l'IGF-1 (insulin-like growth factor 1) qui joue un rôle important dans la croissance des enfants et qui a des effets anabolisants chez l'adulte Thrombopoïétine qui contrôle la production des plaquettes dans la moelle osseuse
Dégradation	L'insuline Hémoglobine Les toxines Conversion de l'ammoniaque en urée
Stockage	Glucose sous forme de glycogène Vitamine A et B12 Fer Cuivre
Coagulation	Synthèse du facteur de coagulation I (fibrinogène), II (prothrombine), V, VII, IX, X, XI, protéine C, protéine S et de l'antithrombine
Défense immunitaire	Filtration du sang par l'intermédiaire des petites fenestrations de l'endothélium sinusoidal Présence de cellules immunitaires dans le système réticulo-endothélial
Régulation de la pression artérielle	Production de l'albumine (produit osmolaire majeur du sérum) Production d'angiotensinogène

➤ Types cellulaires

Le foie est composé de plusieurs populations cellulaires avec au moins 6 différents types cellulaires dont les hépatocytes, les cholangiocytes ou cellules biliaires, les cellules endothéliales sinusoidales, les cellules de Kupffer, les cellules dendritiques et les cellules étoilées (Tableau 2).

Tableau 2 : Types cellulaires du foie humain adulte et marqueurs utilisés pour leurs identifications respectives.

Type cellulaire	Marqueurs cellulaires
Cellules Parenchymateuses	Hépatocytes Albumine, GGT, AAT, OTC, PAH, G6Pase, TAT, CK 8
	Cholangiocytes CK7, CK19, CK14, CK18, EpCAM, p75, ABCG2
Cellules non parenchymateuses	Cellules endothéliales CD14, CD4, ICAM-1, récepteurs éboueurs (scavengers), récepteur du Mannose, CD31, CD133
	Cellules de Kupffer/macrophages CD14, récepteur du galactose, intégrines, récepteur du LDL, F4/80, CD11b, CD32b, CD9, MRC1
	Cellules étoilées Desmine, α SMA, vimentine, gouttelettes lipidiques
	Basophiles CD2, CD11, CD8, CD3, CD56

Abbréviations : GGT : γ -glutamyl-transpeptidases ; AAT : α 1-antitrypsine ; OTC : Ornithine transcarbamylase ; PAH : phenylalanine hydroxylase ; G6Pase : glucose 6-phosphatase ; TAT : tyrosine aminotransférase ; CK : cytokératine ; EpCAM : epithelial cell adhesion molecule ; ABCG2 : ATP-binding cassette sub-familly G member 2 ; ICAM-1 : inter-cellular adhesion molecule 1 ; α SMA : α smooth muscle actin ; LDL : low-density lipoprotein.

Cellules parenchymateuses :

Les hépatocytes

Les hépatocytes représentent environ 60% des cellules du parenchyme hépatique et 80% de sa masse. Ils sont impliqués dans la majorité des fonctions de synthèse et métaboliques du foie [53]. Ce sont de larges cellules polygonales de 25-30 μ m de taille [53]. A la naissance, les cellules du parenchyme hépatique s'organisent en travées larges de deux cellules, appelées muralium duplex. A partir de l'âge de 5 ans, on parle de muralium simplex qui consiste en des travées larges d'une cellule [54]. Le parenchyme est constitué d'un réseau de travées encadrées par les sinusoides favorisant ainsi les interactions entre le sang et les cellules hépatiques [54]. Pour assurer les fonctions métaboliques complexes parfois de façon concomitante, les hépatocytes disposent d'organites nombreux, variés et bien développés. On remarque en

particulier le réticulum endoplasmique qui occupe environ 15% du volume cellulaire, et un cytosquelette bien organisé [55], une centaine de mitochondries, de lysosomes, de peroxysomes et environ une cinquantaine d'appareils de Golgi [54]. La membrane plasmique des hépatocytes est polarisée et on y distingue 3 zones : i) basale ou sinusoïdale (77%) favorisant les échanges d'hormones et autre métabolites avec la circulation sanguine, ii) latérale (15%) impliquée dans la communication intracellulaire (type desmosome), et iii) apicale ou canaliculaire (8%) qui est le lieu de la sécrétion biliaire. Les fonctions métaboliques excrétoires ont lieu à la surface des cellules faisant face aux sinusoïdes. La double polarité excrétoire des hépatocytes nécessite une organisation intracellulaire d'adressage bien établie [56, 57].

Les cholangiocytes

Les cholangiocytes représentent environ 1% du nombre total de cellules dans le parenchyme et sont localisés dans les canaux biliaires [58]. Les cholangiocytes possèdent un réseau dense de cytokératines cytoplasmiques 7 et 19. Par leurs sécrétions, ils modifient la composition de la bile primaire sécrétée par les hépatocytes en altérant son contenu en eau et solutés [59]. Les points de connection des canaux biliaires avec la plaque hépatique forment les canaux de Hering, ce qui correspond aux branches proximales de l'arbre biliaire intrahépatique c'est-à-dire aux connexions entre canalicules biliaires et les canaux biliaires interlobulaires [60]. Au niveau des canaux de Hering ont été décrites les cellules souches hépatiques bipotentes, ou hépatoblastes, capables de générer des hépatocytes et des cholangiocytes [61, 62].

Cellules non parenchymateuses :

Les cellules endothéliales

Les cellules endothéliales des sinusoïdes représentent 3% de la masse du parenchyme hépatique. Elles forment des veines ramifiées en petits capillaires, appelées sinusoïdes qui

irriguent le parenchyme hépatique. L'endothélium des sinusoides est caractérisé par la présence de fenestrations d'un diamètre de 150-170 nm [63, 64]. Sous l'influence d'hormones et de neurotransmetteurs, ces cellules peuvent contracter leur cytosquelette et contrôler les échanges entre le sang et l'espace péri-sinusoïdal [65]. Les cellules endothéliales jouent un rôle dans le transport, la coagulation, la fibrinolyse, l'inflammation, la réponse immune, la régulation de la pression sanguine, l'angiogenèse, le métabolisme des lipides ou encore dans la synthèse de composantes de la matrice extracellulaire [66] (Figure 9) .

Les macrophages ou cellules de Küpffer

Les cellules de Kupffer représentent 2% de la masse du parenchyme hépatique. Elles sont situées dans la lumière des sinusoides, attachées à l'endothélium sinusoïdal [63]. Leur rôle principal est de récupérer le matériel usagé, altéré ou étranger par endocytose. Après activation, elles modulent la fonction des cellules parenchymateuses et sinusoïdales au niveau de la sécrétion de molécules comme les protéases et les cytokines. Elles contribuent avec l'aide des cellules dendritiques à la régulation de la réponse immune (Figure 11).

Les Cellules étoilées

Les cellules étoilées, également nommées cellules de ITO, représentent 5 à 8% du nombre total des cellules du foie et sont localisées dans l'espace de Disse autour des sinusoides (Figure 14). Elles assurent plusieurs fonctions, notamment le métabolisme et le stockage de la vitamine A. Elles participent également à la synthèse, la sécrétion et la dégradation de composantes de la matrice extracellulaire péri-sinusoïdale (collagènes de type I, III, IV, V, VI, les lamines, les protéoglycanes et le collagène non fibrillaire de type XVIII) [67]. Cette matrice est essentielle au maintien des fonctions des hépatocytes et des cellules endothéliales sinusoïdales. L'activation des cellules étoilées en myofibroblastes (expression de la desmine et de l' α -actine) leur permet de contrôler la tonicité microvasculaire et de participer à la réponse fibrotique [67].

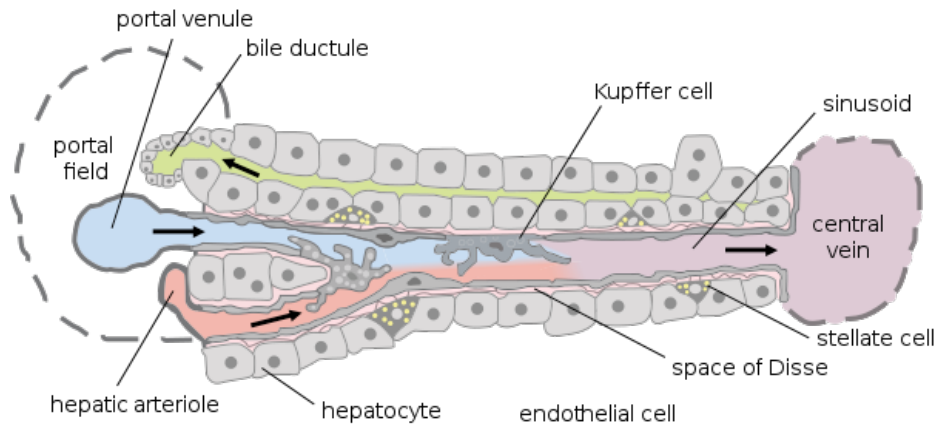


Figure 10: Organisation des différents types cellulaires du foie. Les sinusoïdes sont délimités par une monocouche de cellules endothéliales sinusoïdales. D'après Frevert et al, Plos Biol, 2005 [68].

Les lymphocytes et cellules dendritiques

Le nombre de lymphocytes dans le foie est estimé à 10^{10} cellules localisées le long des sinusoïdes. Le foie centralise une partie importante de la réponse innée et une partie des éléments impliqués dans la réponse acquise [69]. Le foie est impliqué dans la neutralisation et l'élimination des antigènes étrangers notamment les bactéries (réponse innée). Cette réponse innée régule les mécanismes de réparation du foie et notamment au cours de la régénération hépatique [70].

➤ Le lobule hépatique

Toutes ces cellules sont disposées de manière coordonnée et interactionnelle pour former le lobule hépatique, unité structurelle du foie. Il se présente comme un livre dont les « pages » seraient formées par des lames d'hépatocytes orientées de façon radiaire et dont le « dos » correspondrait à la veine hépatique centrolobulaire qui forme l'axe central du lobule. A la périphérie des lobules se trouvent des formations étoilées nommées espaces portes. Ils sont occupés par des vaisseaux issus de la veine porte et de l'artère hépatique ainsi que par les

canaux biliaires (figure 11). Le sang circule entre les lames épithéliales dans des capillaires sinusoides. La circulation est centripète depuis l'espace porte jusqu'à la veine centrolobulaire. La bile progresse en sens inverse de façon centrifuge pour rejoindre les canaux biliaires situés dans les espaces portes (figure 12). Les capillaires sinusoides (figure 13) sont formés par des cellules fenestrées (0.2µm) [52]. Cela permet aux grosses molécules (250 000 daltons) d'entrer au contact direct des hépatocytes dans l'espace de Disse qui est situé entre les capillaires et les lames d'hépatocytes. La composition des liquides remplissant l'espace de Disse est identique à celle du plasma sanguin. Les hépatocytes forment une monocouche autour de chaque capillaire et ils occupent 85% du volume hépatique. Ils sont responsables de la formation de la bile et des différentes transformations métaboliques. Les cellules de Kupffer (5 à 10% du poids hépatique) sont des macrophages situés dans la lumière des capillaires sinusoides et fixés aux intersections de leurs ramifications. Elles ont pour rôle de phagocyter les particules étrangères et microorganismes qui arriveraient de l'intestin avant qu'ils ne gagnent la circulation générale.

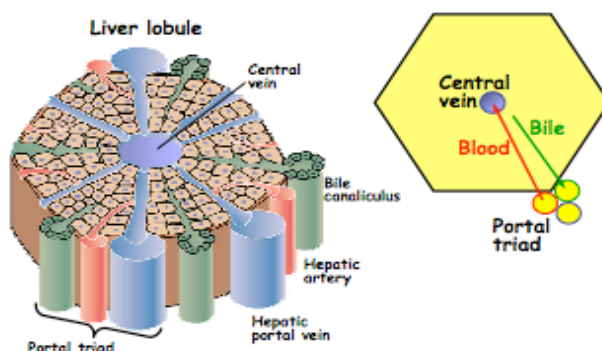


Figure 11 : Schéma de la structure du lobule hépatique, organisé comme un livre ouvert dont le dos serait la veine centro-lobulaire et les pages, les travées d'hépatocytes.

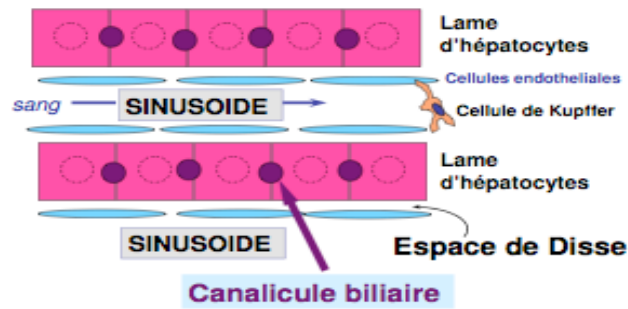


Figure 12 : Parenchyme hépatique et capillaires sinusoides. Les capillaires hépatiques sont fenestrés ce qui permet un passage des grosses molécules du sang vers l'espace de Disse [52].

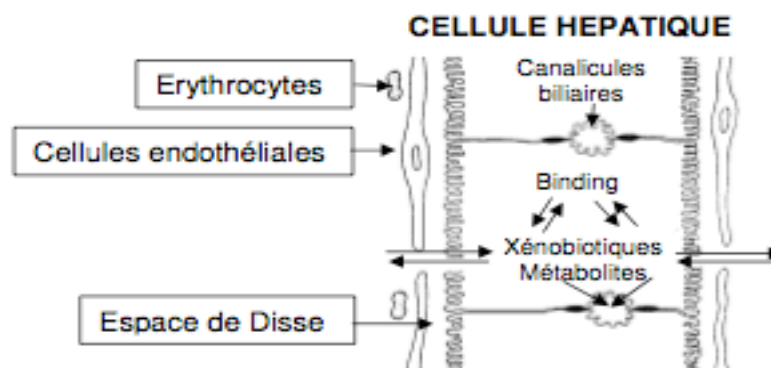


Figure 13 : Formation de la bile par les hépatocytes et élimination par les canalicules biliaires [52].

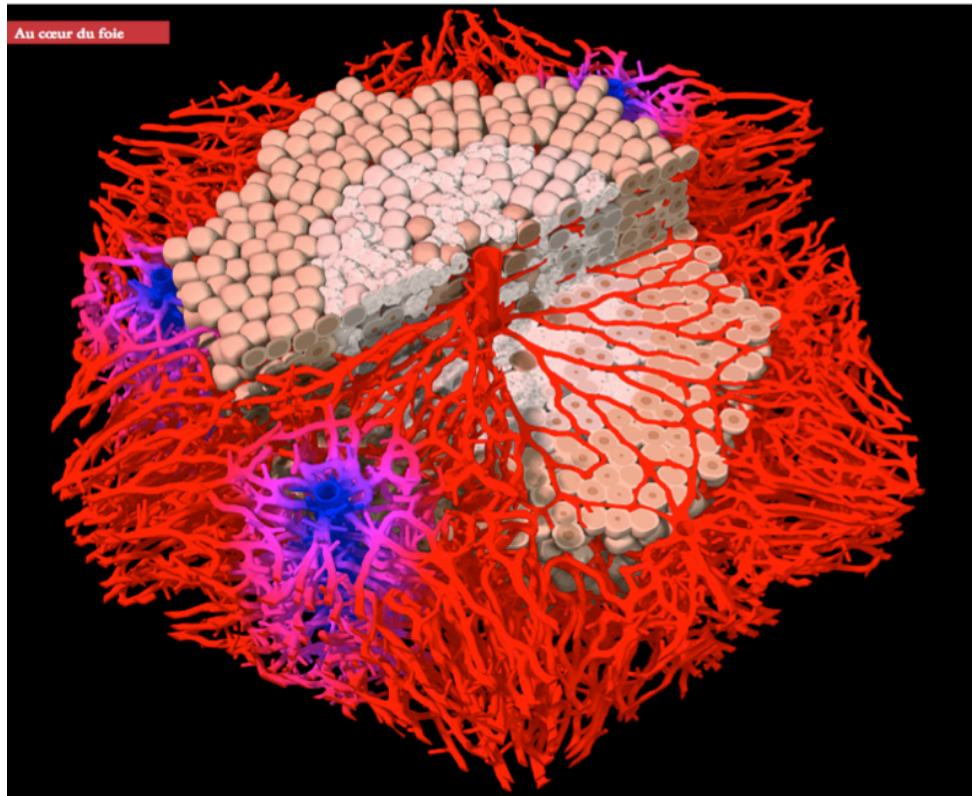


Figure 14 : Représentation en trois dimensions et en coupe d’une structure du lobule hépatique par reconstruction informatique [71]. Les différents éléments représentés sont : les vaisseaux sanguins (en rouge), les cellules hépatiques ou hépatocytes (les sphères) et les noyaux cellulaires (en marron).

L’unité structurale et fonctionnelle du foie est le lobule hépatique (Figure 14). Certains éléments du lobule sont bien visibles : les vaisseaux sanguins (en rouge) et les cellules hépatiques ou hépatocytes (les sphères). Chaque hépatocyte est délimité par une membrane et contient un noyau (en marron). Statistiquement, les lobules hépatiques ont une forme qui se rapproche d’un hexagone et sont constitués de travées de cellules qui rayonnent à partir du centre du lobule, où se trouve un important vaisseau sanguin, la veine centrale. À la périphérie du lobule, à chacun des coins, se situent d’autres vaisseaux sanguins (veinule porte et artériole) qui alimentent en sang le lobule. Ce sang se mélange ensuite au niveau du passage dans des vaisseaux de plus petit diamètre, les sinusoides qui se trouvent entre les hépatocytes, et quitte le

lobule par la veine centrale. Grâce aux diverses fonctions des hépatocytes, le sang contient moins de produits toxiques quand il sort du foie que quand il y entre et est chargé en protéines et lipides synthétisés par les hépatocytes. Pour faciliter les échanges, les vaisseaux sanguins se trouvant entre les travées de cellules sont dilatés et peu étanches.

La figure 14 est une représentation d'un foie, quelques heures après une intoxication au tétrachlorure de carbone. L'obtention de cette vue en trois dimensions et en coupe a nécessité la mise en oeuvre d'outils informatiques [71-73]. Un nombre de plus en plus important de cellules au centre du lobule se nécrosent (apparaissant alors plus clairs) à cause de l'intoxication. La couleur rouge montre les vaisseaux sanguins et la couleur bleue, la position des triades portales. Le foie est un organe très spécifique, car même si plus de 60 % de sa masse totale est abîmée (voire jusqu'à 90 % pour les rats), il peut se régénérer complètement. Cette capacité extraordinaire est essentielle. Le foie est un des organes métaboliques les plus importants et en particulier il permet de détoxifier le sang. Pour réaliser ces tâches, le foie a une anatomie très complexe, qu'on étudie à trois échelles différentes. Le foie humain comprend deux lobes principaux.

Il est composé d'environ un million de petits lobules (contre un millier chez la souris), mesurant au maximum un à deux millimètres [52]. Cette architecture permet au sang d'avoir un contact optimal avec les hépatocytes quand il traverse l'organe. Quand un foie s'est remis de dommages causés par les drogues, l'alcool, ou une infection virale, cette architecture doit être restaurée. Les mécanismes à l'oeuvre sont encore peu compris. Des chercheurs, menés par Dirk Drasdo à l'Inria près de Paris et au Centre de bio-informatique de Leipzig, ont commencé à étudier la régénération du foie en utilisant des modèles virtuels, notamment sur des souris [71-73]. Ils ont simulé sur ordinateur un scénario d'intoxication de souris au tétrachlorure de carbone, équivalent à une surdose de paracétamol chez l'homme [71-73]. La première des trois étapes consistait à obtenir une représentation informatique d'un lobule moyen du foie. La

seconde a enregistré le processus de régénération dans le foie des souris et y a introduit des paramètres. Enfin, en se basant sur ces paramètres, un modèle mathématique a été développé avec lequel la dynamique spatiotemporelle de chaque hépatocyte et vaisseau sanguin pouvait être simulée sur ordinateur. Avec leur modèle informatique, ces scientifiques ont pu identifier des mécanismes de la régénération du foie autrefois inconnus.

1.1.4. Rôles et répartition des fonctions hépatiques

Suivant l'axe porto-central, les hépatocytes montrent une grande hétérogénéité dans leur ultra-structure, leurs activités enzymatiques, leur sensibilité aux drogues et leur prolifération qui s'organise en fonction des gradients de pression vasculaire et d'oxygène [74]. Les différentes fonctions métaboliques sont donc réparties en fonction des zones du parenchyme hépatique. Ainsi pour l'expression des gènes reliés au métabolisme, on en distingue 2 zones dans chaque lobe hépatique, une zone périportale et une zone péricentrale. Par exemple, l'expression de HNF4 α induit le recrutement d'histone déacétylase de type 1, HDAC1, qui en remaniant la chromatine va induire l'inhibition de l'expression de gènes périportaux dont celui de la GS (glutamine synthétase). La voie WNT, participe également à la zonation avec notamment la β -Caténine et APC (Adenomatous Polyposis Coli ; inhibiteur de la voie) et jouent aussi un rôle dans la régulation de la zonation. La β -Caténine est exprimée dans la zone péricentrale tandis que l'APC est exprimée dans la zone périportale [75, 76]. Une perte de l'APC entraîne l'expression de *novo* des gènes cibles de la β -Caténine au niveau des hépatocytes périportaux et la suppression des gènes exprimés dans les cellules périportales [77]. Ce concept de zonation permet d'expliquer que des fonctions métaboliques antagonistes soient effectuées simultanément comme la glycolyse et la gluconéogenèse dans les hépatocytes péricentraux et périportaux.

Les hépatocytes périportaux ont la particularité d'être diploïdes, mesurent environ 30 µm de diamètre. Ils sont localisés dans une zone de larges fenestrations de l'endothélium (175 nm) où la pression en oxygène est la plus élevée. Ils sont principalement impliqués dans l'uréogénèse, la gluconéogénèse, la β -oxydation des acides gras, la dégradation des acides aminés, la formation de la bile et la synthèse d'albumine et de cholestérol.

Les hépatocytes centrolobulaires sont souvent tétraploïdes [78] et mesurent environ 40µm de diamètre. Ils sont localisés dans une zone à faible pression en oxygène où les fenestrations de l'endothélium sont plus étroites. Ils sont principalement impliqués dans la captation du glucose, la glycolyse, le métabolisme des xénobiotiques (détoxification), la lipogénèse, la synthèse de glutamine et la cytogénèse [79].

Le foie assure donc la fonction de détoxification de substances nocives circulant au niveau splanchnique et les empêche ainsi de passer dans la circulation générale (Tableau 1). Cette tâche est assurée grâce à de multiples systèmes enzymatiques qui métabolisent de nombreuses drogues [80, 81] y compris l'alcool. Le foie reste sensible aux lésions dues aux médicaments. Après la biotransformation, les métabolites hydrosolubles sont excrétés et éliminés dans la bile ou par voie urinaire. Ainsi le foie détoxifie l'ammoniaque et l'élimine sous forme d'urée.

1.2. Insuffisance hépatique et cirrhose

L'insuffisance hépatique est une diminution de la masse fonctionnelle du foie consécutive à une destruction ou une déficience des hépatocytes. L'insuffisance hépatique aiguë (IHA) correspond à la perte brutale des fonctions hépatiques en l'absence de pathologie hépatique préexistante. Elle est responsable d'une atteinte multiviscérale comprenant notamment une défaillance circulatoire vasoplégique, une défaillance rénale et pulmonaire. Les manifestations neurologiques de l'insuffisance hépatique aiguë (encéphalopathie, oedème cérébral, hypertension intracrânienne) peuvent conduire au décès par engagement cérébral. La prise en

charge de cette pathologie comprend la détermination du diagnostic et de l'étiologie de l'insuffisance hépatique afin d'en déterminer le pronostic spontané et d'administrer un éventuel traitement spécifique. L'insuffisance hépatique peut être aiguë comme dans les intoxications brutales, au paracétamol par exemple, ou plus souvent, d'installation chronique comme dans l'évolution des hépatites virales, les cirrhoses du foie, les cancers ou des maladies métaboliques. L'insuffisance hépatique est matérialisée par un défaut de fonctionnement du foie qui se traduit par diverses perturbations de son métabolisme.

La définition de l'insuffisance hépatique sévère est sujette à débat [82]. Une perturbation de la coagulation, avec notamment une baisse du taux de prothrombine en dessous de 50 %, ou mieux une chute du taux de facteur V en dessous de 50 %, est nécessaire pour porter le diagnostic [83]. L'incidence de l'insuffisance hépatique fulminans est inférieure à 200 cas par an en France [82]. Aux États-Unis, elle était évaluée à 2 500 cas/an [84]. Les causes iatrogènes prédominent dans les pays occidentaux. Plusieurs médicaments (notamment le paracétamol et les AINS), même utilisés à doses thérapeutiques, peuvent entraîner une nécrose hépatique [85, 86]. Il convient de différencier l'insuffisance hépatique survenant au cours des hépatites aiguës, de l'insuffisance hépatique retrouvée au cours de la cirrhose.

L'intoxication au paracétamol est la première cause d'IHA en Europe et la N Acetyl-Cystéine, traitement étiologique des intoxications au paracétamol, est actuellement utilisée quelle que soit la cause de l'insuffisance hépatique. L'utilisation de techniques d'assistance hépatique ne semble pas améliorer le pronostic des patients souffrant d'insuffisance hépatique aiguë et pouvant être transplantés [87].

Le recours à la transplantation hépatique est guidé par l'utilisation de scores pronostiques spécifiques [88]. Elle permet d'améliorer significativement la survie des patients souffrant d'insuffisance hépatique aiguë qui est actuellement de 70 % à 1 an hormis en cas d'encéphalopathie sévère ou la survie sans transplantation est de l'ordre de 30 % [87].

Pour ce qui est de la cirrhose hépatique, elle correspond au stade terminal de maladies chroniques actives du foie [82]. Elle associe une insuffisance hépatocellulaire et une hypertension portale à différents degrés. L'origine alcoolique et médicamenteuse représente environ 50 % des causes de cirrhose. Les hépatites virales sont également une cause fréquente. Elle représente la quatrième cause de décès aux États-Unis chez les sujets de moins de 65 ans. En France, la prévalence de la cirrhose alcoolique est de 3 000 cas par million d'habitants et elle est trois fois plus fréquente chez les hommes que chez les femmes [82].

Les lésions du foie ou du système biliaire peuvent avoir des causes variées :

- toxiques : toxines bactériennes, empoisonnement par des métaux ou métalloïdes, pesticides, chimiques ou médicaments hépatotoxiques, auto-empoisonnement par des endotoxines, etc [89]
- infectieuses : virale, bactérienne, parasites (ex : douve du foie, échinococose alvéolaire...) ;
- métaboliques (ex : glycogénoses et les lipidoses) ;
- maladies dysimmunitaires ou auto-immunes avec des causes génétiques et/ou héréditaires)
- hypertension portale
- alcoolisme
- stéatose hépatique non alcoolique ; malformations congénitales
- anomalies vasculaires du foie
- porphyries hépatiques (qui sont des maladies héréditaires induites chacune par un déficit spécifique en l'un des enzymes participant à la biosynthèse de l'hème).

Toutes ces atteintes peuvent prendre la forme de cirrhoses, cancers, d'insuffisance hépatique (chronique, fulminante ou subfulminante) ou de maladies kystiques non parasitaires. Il existe de nombreuses classifications dont la Classification internationale des maladies strictement

associées au foie (tableau 3). Nous nous concentrerons sur les maladies métaboliques du foie qui sont la cible de la thérapie cellulaire hépatique aujourd'hui.

Tableau 3. Classification internationale des maladies du foie

Maladie alcoolique du foie (K70)	Maladie toxique du foie (K71)	Insuffisance hépatique, non classée ailleurs (K72)	Hépatite chronique, non classée ailleurs (K73)	Fibrose et cirrhose du foie (K74)	Autres maladies inflammatoires du foie (K75)	Autres maladies du foie (K76)	Atteintes hépatiques au cours de maladies classées ailleurs
Cirrhose alcoolique graisseuse du foie	Maladie toxique du foie avec cholestase	Insuffisance hépatique aiguë et subaiguë	Hépatite chronique persistante, non classée ailleurs	Fibrose hépatique	Abcès du foie	Péliohe hepaticque	Atteintes hépatiques au cours de maladies infectieuses et parasitaires classées ailleurs
Hépatite alcoolique	Maladie toxique du foie avec nécrose hépatique	Insuffisance hépatique chronique	Hépatite chronique lobulaire, non classée ailleurs	Sclérose hépatique	Phlébite de la veine porte	Dégénérescence graisseuse du foie, non classée ailleurs	
Fibrose et sclérose alcooliques du foie	Maladie toxique du foie avec hépatite aiguë	Insuffisance hépatique, sans précision	Hépatite chronique active, non classée ailleurs	Fibrose hépatique, avec sclérose hépatique	Hépatite réactive non spécifique	Congestion passive chronique du foie	Atteintes hépatiques au cours d'autres maladies classées ailleurs
Cirrhose alcoolique du foie	Maladie toxique du foie avec hépatite chronique persistante		Autres hépatites chroniques, non classées ailleurs	Cirrhose biliaire primitive	Hépatite granulomateuse, non classée ailleurs	Nécrose hémorragique centrale du foie	
Insuffisance hépatique alcoolique	Maladie toxique du foie avec hépatite chronique lobulaire		Hépatite chronique, sans précision	Cirrhose biliaire secondaire	Autres maladies inflammatoires précisées du foie	Infarctus hépatique	
Maladie alcoolique du foie, sans précision	Maladie toxique du foie avec hépatite chronique active			Cirrhose biliaire, sans précision	Maladie inflammatoire du foie, sans précision	Maladie veino-occlusive du foie	
	Maladie toxique du foie avec hépatite, non classée ailleurs			Cirrhoses du foie, autres et sans précision		Hypertension portale	
	Maladie toxique du foie avec fibrose et cirrhose du foie					Syndrome hépato-rénal	
	Maladie toxique du foie avec d'autres lésions du foie					Autres maladies précisées du foie	
	Maladie toxique du foie, sans précision					Maladie du foie, sans précision	

1.3. Les maladies métaboliques du foie

Le foie présente un potentiel régénératif lui permettant de préserver son homéostasie. Il existe de nombreuses maladies hépatiques caractérisées par des défauts de prolifération des hépatocytes résultant d'une détérioration aiguë ou chronique des tissus hépatiques. Un déficit héréditaire d'une enzyme hépatique ou d'une protéine de transport peut altérer le métabolisme des protéines, glucides et des lipides. Ces déficits peuvent être classées en (Tableau 4):

- maladies qui engendrent des altérations dans la structure des tissus hépatiques avec une insuffisance hépatique ou une cirrhose (classe 1)
- maladies causées par des défauts métaboliques altérant uniquement ou essentiellement le foie entraînant des désordres multi-systémiques (classe 2).

Environ, une naissance sur 900 présente une maladie hépatique métabolique héréditaire comme les troubles du cycle de l'urée, le syndrome de Crigler-Najjar, le déficit en α -1 anti-trypsine [90, 91]. Dans plusieurs cas de maladies hépatiques, le désordre est plutôt généralisé comme pour le stockage du glycogène (glycogénose) et des lipides. Dans d'autres maladies, le foie est le principal organe altéré comme l'hémochromatose génétique (surcharge en fer), le déficit en α -1 anti-trypsine et la maladie de Wilson (surcharge en cuivre).

En général, les symptômes des maladies hépatiques innées se manifestent dès la naissance. Les nouveau-nés malades sont confrontés à des risques d'altération neuro-psychomotrice et à la mort. Il existe des tests de dépistage pour certaines de ces maladies permettant de s'orienter vers un traitement préventif adéquat. Le suivi de ce type de maladie reste difficile. Les malades sont confrontés à une mauvaise qualité de vie surtout à l'aggravation de la maladie avec le temps.

Tableau 4. Maladies métaboliques du foie

Maladies	Épidémiologie	Pathologie	Symptômes	Traitements
Classe 1				
Déficience en α-1 antitrypsine	1/600-2000	Diminution de l'exportation par les hépatocytes des molécules mutantes Z α-1 antitrypsine polymérisées entraînant la mort des hépatocytes et le déficit en α-1 antitrypsine circulante	*Cholestase néonatale *Insuffisance hépatique *maladie hépatique chronique	Transplantation du foie
Wilson	1/30000-50000	Mutation du gène du transporteur de cuivre ATP-dépendent, responsable de l'excrétion biliaire et l'incorporation du cuivre dans la céruloplasmine. Ceci entraîne l'accumulation du cuivre dans le foie et par la suit, entre autres, dans le cerveau, la cornée et les reins	*Présence d'anneaux de Kayser-Fleischer *Bas niveaux de céruloplasmine dans le sérum *Taux élevé de cuivre dans les urines et les biopsies du foie *Cirrhose *Insuffisance hépatique fulminante *Lésions neurologiques	*Thérapie par chélation avec ou sans zinc (D-pénicillamine, trientine, ammonium tétrathiomolybdate) *Transplantation du foie
Hémochromatose néonatale	<200000 patients aux Etats Unis	Stockage d'une grande quantité de fer au niveau du foie, du pancréas et des glandes endocrines	*La maladie se déclare dans le mois suivant la naissance. *Insuffisance hépatique aiguë *Taux élevé de ferritine *Saturation en fer élevée (>98%) *Hypoalbuminémie *Hypoglycémie *Hyperbilirubinémie *Coagulopathie *Sidérose extra-hépatique	*Injection intraveineuse hebdomadaire d'immunoglobulines à partir de la semaine 18 de la gestation pour les femmes ayant déjà un enfant malade *Transplantation du foie
		Type Ia: Déficit de l'enzyme catalytique Type Ib: Déficit du transporteur de la G6P	*Hypoglycémie *Abdomen protubérant *Retard de croissance *Dysfonction rénale *Risque élevé d'adénome hépatique *Neutropénie *Maladies inflammatoires chroniques intestinales	*Prévention de l'hypoglycémie *Transplantation du foie
Glycogénose	Inconnue	Type III: mutation du gène codant l'enzyme débranchant du glycogène	*Hypoglycémie *Fibrose hépatique et tumeurs chez l'adulte *Faiblesse musculaire	*Régime alimentaire adéquat
		Type IV: mutation du gène codant l'enzyme branchante du glycogène	*Cirrhose infantile avec ou sans problème cardiaque et neurologique *Maladie hépatique chronique avec une hépato- splénomégalie *Hypertension portale *Retard de croissance staturo-pondérale	*Transplantation du foie si le foie est le seul organe affecté
Classe 2				
Troubles du cycle de l'urée	Inconnue	Déficience du cycle de l'urée dans les hépatocytes entraînant une accumulation des déchets d'azote notamment l'ammoniac (neurotoxique)	*Hyperammoniémie *Paralysie centrale spasmodique *Retard psychomoteur *Hyperactivité *Retard de croissance	*Régime alimentaire sans protéine *Administration par voie orale de benzoate de sodium et de phénylacétate *Supplémentation en arginine en cas de déficience en argininosuccinate synthase ou arginase *Transplantation du foie
Syndrome de Crigler-Najjar	1/1000000	Type 1et 2: ne sont pas sensibles à l'induction enzymatique	*Ictère nucléaire * Des sévères lésions neuronale *Jaunissement intense au niveau des noyaux gris centraux, cervelet et les noyaux bulbaires chez les patients non traités *Ataxie *Athétose *Convulsion *Dysarthrie *Ralentissement mentale	Type 1: * Échange du sang pour diminuer le taux de bilirubine non conjuguée *Photothérapie à une longueur d'onde égale à 450 nm(Lumière bleue/verte) *Transplantation du foie (le seul traitement définitif avant l'apparition des lésions neuronale) Type 2: Diminution du jaunissement par l'induction de l'activité résiduel des enzymes sous l'effet des phénobarbital

Le foie peut également être la cible de maladies acquises comme :

- les hépatites : celles-ci désignent toute inflammation aiguë ou chronique du foie.

L'hépatite est due souvent à un virus, un abus d'alcool, certains médicaments ou être d'origine auto-immune. La forme aiguë est le résultat observé après le contact de

l'organisme avec le virus. La forme chronique est le résultat de la persistance des symptômes au-delà de 6 mois. Une hépatite aiguë peut s'aggraver et devenir fulminante, une hépatite chronique dégénérer en une cirrhose et/ou bien un cancer.

- La cirrhose : C'est une aggravation d'une fibrose ou d'une stéatose. La fibrose hépatique consiste en l'accumulation excessive dans le parenchyme d'une matrice extracellulaire de composition altérée. La stéatose est l'accumulation de triglycérides dans le foie et est souvent rencontrée chez les obèses, les diabétiques ou encore les alcooliques. La cirrhose est une altération structurale et fonctionnelle du foie. Les altérations structurales se présentent par une destruction des hépatocytes suivie par des lésions de fibrose en alternance avec des plages de régénération cellulaires. La régénération cellulaire, notamment hépatocytaire, anarchique entraîne la formation de nodules n'ayant pas de connexions vasculaires et biliaires avec des désorganisations de la micro-vascularisation liée à la fibrose. Elle est caractérisée par une augmentation de l'activité sérique des transaminases.
- Les cancers : on distingue des cancers primitifs et les métastases. Le cancer primitif le plus fréquent est le carcinome hépatocellulaire. Ce dernier est caractérisé par une prolifération néoplasique d'origine hépatocytaire souvent suite à une cirrhose ou une hépatite chronique. Les métastases hépatiques sont causées en général par des cellules cancéreuses apportées par la circulation splanchnique et venant de tumeurs du côlon, pancréas ou autre.

1.4. Quels traitements disponibles aujourd'hui pour ces pathologies?

1.4.1. Traitement symptomatique

La perte de fonctionnalité du foie se traduit par la perte des fonctions hépatiques métaboliques, de synthèse et d'élimination ainsi que par un retentissement systémique avec syndrome

inflammatoire systémique et défaillance multi-organes. L'insuffisance hépatique est dite sévère si le taux de prothrombine (TP) est inférieur à 50 %. L'hépatite aiguë grave est caractérisée par la coexistence d'une insuffisance hépatique aiguë et d'une encéphalopathie, on parle alors d'hépatite fulminante. On estime que seuls 10 % des patients souffrant d'hépatite aiguë développent une forme sévère et moins de 1 % d'entre eux une forme grave. Ainsi, le délai qui sépare le début de l'ictère de l'apparition de encéphalopathie permet de caractériser des formes fulminantes (< à 15 jours) et sub-fulminantes (15 jours-3 mois). L'Acute Liver Failure Study Group a défini l'IHA par l'association d'un INR supérieur à 1,5 soit un TP approximativement inférieur à 50 % et l'existence d'une encéphalopathie dans les 26 semaines suivant le début des symptômes [92]. Dans la pratique, c'est l'association d'un TP inférieur à 50 % et d'une encéphalopathie qui constitue un motif certain de transfert en réanimation spécialisée.

Les traitements étiologiques spécifiques sont peu nombreux [93]. Lorsqu'ils existent, ils doivent néanmoins être débutés précocement. La N-acétyl-Cystéine, antagoniste du paracétamol et précurseur du glutathion doit être administrée le plus précocement possible en cas de suspicion d'intoxication au paracétamol [94]. Son utilisation systématique quel que soit l'origine de l'IHA tend à se répandre. En l'absence de geste invasif ou de saignement clinique significatif, les anomalies biologiques de l'hémostase ne doivent donc pas être corrigées de façon systématique afin de pouvoir continuer à apprécier l'évolution naturelle du TP et du facteur V qui sont deux facteurs indispensables à l'appréciation de l'évolution de la maladie.

L'hémofiltration veino-veineuse continue est la technique d'épuration extrarénale habituellement utilisée en particulier en cas d'IHA avec insuffisance rénale [95]. Cette hémofiltration hépatique pourrait être une méthode transitoire en attendant un greffon ou une régénération hépatique. Lors de la réanimation de l'IHA, une grande attention doit être portée à la survenue d'hypoglycémie, d'hypophosphorémie. Comme pour tout patient cérébro-lésé, la natrémie doit être contrôlée très régulièrement en luttant contre l'hyponatrémie et en essayant

d'éviter les variations brutales de cet électrolyte [93].

1.4.2 La transplantation d'organe

La transplantation orthotopique consiste à remplacer le foie malade par une allogreffe en respectant l'emplacement anatomique de l'organe. Il est même possible aujourd'hui de réaliser une transplantation hépatique à partir d'un greffon partiel provenant d'un donneur vivant apparenté au receveur. Le plus fréquemment, le greffon provient d'un donneur déclaré en état de mort encéphalique. Malgré le développement important des techniques opératoires, la transplantation hépatique (TH) est restée au stade expérimental dans les années 1970, avec une survie des patients à un an avoisinant les 25%. L'introduction de la ciclosporine a nettement amélioré la survie des patients, si bien que les années 1980 ont vu la transplantation hépatique devenir le traitement de choix pour les adultes et les enfants atteints de maladies hépatiques chroniques ou fulminantes. La première transplantation hépatique a eu lieu en 1963 [96]. Les premières transplantations hépatiques restent complexes [97, 98]. De nombreux progrès dans la gestion de l'état du receveur ont été réalisés depuis lors grâce une amélioration considérable dans la technologie de conservation des organes, au développement des techniques chirurgicales et à l'introduction d'un régime immunosuppresseur efficace.

La transplantation orthotopique du foie est maintenant une référence en matière de traitement clinique pour les patients adultes et pédiatriques présentant des indications appropriées comme pour les patients atteints de maladies chroniques du foie présentant une insuffisance hépatique aiguë sévère compromettant le pronostic vital. Cependant, on ne peut pas négliger le problème d'accès à cette thérapeutique à cause de la pénurie grandissante de greffons (Tableau 5). Le nombre de patients nécessitant une greffe ne cesse d'augmenter et ce plus vite que le nombre de donneur ce qui explique la chute constante depuis 2007 du pourcentage d'accès à la greffe qui est passé de 56% à 42% sur les derniers chiffres disponibles de 2013 [99]. Une petite marge de

manœuvre est possible d'après les chiffres français sur le taux de donneurs prélevés qui augmente pour le foie passant de 68% en 2007 à 77% en 2013 mais il reste en-dessous des 96% réalisés pour le rein [99].

A titre d'exemple, une dizaine de donneurs d'organes par million de patients a été enregistrée chaque année en Europe et aux Etats-Unis [100]. Par conséquent, environ 15% des patients adultes atteints de maladies hépatiques mortelles meurent durant la période d'attente du greffon (Tableau 6) [101]. Par conséquent, il y a un besoin urgent et pressant de développement d'alternatives thérapeutiques.

Tableau 5. Evolution de la liste d'attente et devenir des candidats en greffe hépatique [99].

	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
Liste d'attente							
Nombre de malades en attente au 1 ^{er} Janvier (pmh)	21,3	21,6	22,9	24,4	25,3	26,3	27, 7
% Malades en attente avec contre indication temporaire	17	25	22	24	27	32	26
Nouveaux inscrivent chaque année	1346	1372	1465	1580	1532	1721	2026
Nombre de Décès /an	116	107	136	170	136	182	198
% de patients décédés inscrivent sur la liste	6,2	5,5	6,4	7,1	5,5	6,8	6,3
Taux d'accès à la greffe %	56	52	49	46	47	44	42,4
Grefe							
Grefe en pmh	16,8	15,9	16,4	16,9	17,9	17,7	18,9
% de donneur prélevé	68	67	72	75	75	75	77
<i>pmh: nombre de patients par million d'habitant</i>							

Tableau 6. Evolution du nombre de décès et des sorties pour aggravation de la maladie avant greffe sur la liste d'attente depuis 2007 chez les malades en attente d'une greffe hépatique [99].

	2007	2008	2009	2010	2011	2012
Evolution sur le nombre de décès uniquement						
Nombre total de décès	116	107	136	170	136	182
Pourcentage de décès parmi les inscrits*	6,2%	5,5%	6,4%	7,1%	5,5%	6,8%
Décès parmi les nouveaux inscrits	82	90	97	121	92	121
Pourcentage de décès parmi les nouveaux inscrits	6,1%	6,6%	6,6%	7,7%	6,0%	7,0%
Taux d'incidence (nombre de décès pour 1 000 patients x année)	213,8	171,8	184,3	195,4	143,5	178,2
Evolution sur le nombre de décès et les sorties de liste pour aggravation						
Nombre total de décès ou aggravation	167	192	217	282	241	292
Pourcentage de décès ou aggravation parmi les inscrits*	8,9%	9,9%	10,2%	11,8%	9,8%	11,0%
Décès ou aggravation parmi les nouveaux inscrits	109	133	135	168	147	164
Pourcentage de décès ou aggravation parmi les nouveaux inscrits	8,1%	9,7%	9,2%	10,6%	9,6%	9,5%
Taux d'incidence (DC + AG)	307,7	308,2	294,1	324,1	254,2	286,0
*receveurs en attente au 1er janvier de l'année + nouveaux inscrits						

La transplantation de foies issus de donneurs vivants offre de nouvelles possibilités pour résoudre la pénurie de donneurs et réduire les complications qui peuvent survenir à partir de foies cadavériques. En un an, la survie des patients par transplantation du foie enregistrée aux États-Unis en 2011 était d'environ 86,4% (avec donneurs décédés) à 87,3% (avec donneurs vivants) selon The U.S. Organ Procurement and Transplantation Network and the Scientific Registry of Transplant [102]. Cette alternative avec les donneurs vivants reste limitée par les risques opératoires élevés avec la possibilité de complications thrombotiques et hémorragiques. Pour les cas d'IHA, la transplantation hépatique (TH) est envisagée quand la régénération hépatique semble peu probable dans un délai compatible avec la survie. En cas d'IHA associée à un syndrome de défaillance multiviscérale, il peut être difficile de déterminer la séquence exacte de survenue des défaillances. S'agit-il d'une IHA responsable d'une multidéfaillance ou d'une multidéfaillance avec IHA ? Cette distinction est importante puisque que la TH est indiquée dans la première situation et contre-indiquée dans la seconde. Le recours à la transplantation balance constamment entre une indication précoce qui vise à réduire la mortalité en liste d'attente et péri-opératoire mais qui expose à des transplantations « trop » précoces et

une inscription plus tardive dans le cours d'évolution de la maladie qui comporte une majoration du risque de mortalité en liste d'attente et péri-opératoire mais qui permet d'éviter des transplantations inutiles. Les critères de Clichy et du Kings College restent quotidiennement utilisés en dépit de leur manque de sensibilité (tableau 7) [88]. Les critères pronostiques idéaux devraient permettre non seulement de prédire un devenir défavorable mais surtout de reconnaître rapidement les patients qui vont mourir en l'absence de transplantation de ceux qui vont récupérer avec uniquement un traitement symptomatique. Historiquement, les critères de Clichy puis ceux du Kings College ont été publiés et ils sont toujours utilisés actuellement pour prédire la nécessité de transplantation [87]. Ils comprennent l'âge, la sévérité de l'encéphalopathie, le facteur V ou l'INR, ou le pH Sanguin. Les critères du Kings College diffèrent en fonction de l'étiologie (intoxication au paracétamol ou non), d'autres critères ont été proposés comme la lactatémie, l'ammoniémie, la phosphorémie, l'activité caspase...[87, 93] En pratique, les patients sont inscrits sur liste nationale et classés en s'aidant de ces critères. Une nouvelle évaluation de l'état clinique est indispensable au moment de l'acceptation du greffon afin de s'assurer d'une part qu'il n'existe pas de signe de reprise de la fonction hépatocellulaire et d'autre part que la gravité des défaillances multiviscérales associées à l'IHA n'a pas atteint un point de non retour. Dans une série anglaise, 26 % des patients (327/1 237) souffrant d'IHA ont été inscrits en vue d'une transplantation, 80 % de ces patients ont effectivement été transplantés avec une survie globale après transplantation de 70 % pour un délai médian de suivi de 57 mois. Parmi les 974 patients non transplantés, 29 % sont décédés majoritairement dans le mois suivant le début de l'IHA [103, 104]. Actuellement, la survie sans transplantation des patients souffrant d'IHA se situe entre 21% et 39 % en cas d'encéphalopathie sévère et entre 28 et 67 % en cas d'encéphalopathie modérée [105].

Tableau 7 : Critères de transplantation en urgence en cas d'IHA

Critères	Valeurs
Critères de Clichy [93]	Confusion ou coma (encéphalopathie grade 3 et 4) Facteur V < 30 % si âge > 30 ans ou Facteur V < 20 % si âge < 30 ans
Critères du Kings College [106-108]	
Hépatite fulminante liée au paracétamol	pH < 7,3 ou Lactate artériel > 3 (après remplissage vasculaire) Créatinine > 300 µm/l plus INR > 6,5 plus encéphalopathie hépatique > grade 3
Hépatite fulminante non liée au paracétamol	INR > 7 ou au moins trois des critères suivants : INR > 3,5 Bilirubine > 300 µm/l Âge < 10 ans ou > 40 ans, Délai ictère-encéphalopathie > 7 jours

La TH est actuellement effectuée dans la plupart des grands centres universitaires d'Europe. A un an post-greffe, la survie des patients est de 85 à 90%, et les résultats continuent de s'améliorer, même si la transplantation hépatique reste une procédure lourde, avec un certain risque de complications [99]. Malheureusement, la disponibilité des organes susceptibles d'être greffés est de loin inférieure au nombre de bénéficiaires potentiels, une réalité qui a stimulé le développement de la transplantation hépatique «donneur vivant». Elle est également l'un des traitements les plus coûteux de la médecine moderne.

1.4.3 Les foies artificiels et organoïdes hépatiques

Il existe 2 types d'assistances hépatiques artificielles : le foie artificiel, purement mécanique ou le foie bio-artificiel, un système artificiel contenant des hépatocytes vivants [109].

➤ Le foie artificiel

Le foie artificiel, sorte de dialyse hépatique, est un procédé de traitement visant à débarrasser le sang des toxines qui s'y accumulent à cause du mauvais fonctionnement du foie. Ce procédé s'est montré prometteur pour les patients présentant un syndrome hépato-rénal. Il est similaire à l'hémodialyse utilisée pour traiter l'insuffisance rénale. Il élimine surtout les toxines hydrosolubles mais malheureusement pas les toxines liées à l'albumine qui s'accumulent lors de l'insuffisance hépatique. De nos jours, la suppléance artificielle du foie est basée essentiellement sur des techniques d'épuration extra-corporelle. Il existe trois systèmes d'appareils de dialyse hépatiques:

- Le système MARS (Molecular Adsorbants Recirculation System) : c'est le système de dialyse extracorporelle hépatique sans cellules le plus connu. Il utilise une membrane couverte d'albumine et quasi imperméable aux protéines. Ce système existe depuis 1999 et a été évalué principalement chez les malades ayant une insuffisance hépatique aiguë sur hépatopathie chronique. Il a permis une baisse significative de la bilirubine et une amélioration de l'hémodynamique des malades [110] ainsi qu'une diminution des encéphalopathies hépatiques dans certains cas [111, 112]. Ce système est capable d'évacuer les toxines du sang comme l'ammoniac et les acides biliaires mais il n'est toutefois pas en mesure de produire les substances vitales produites normalement par le foie [113].

- Le système SPAD (Single Pass Albumin Dialysis), est une méthode simple utilisant l'albumine dans la machine de dialyse rénale sans système supplémentaire de perfusion ; le sang du patient circule dans un circuit avec un filtre identique à celui utilisé dans le système

MARS. L'autre côté de la membrane est parcourue par une solution d'albumine circulant à contre-courant qui est jetée après être passée dans le filtre.

- Le système Prométhée, est un nouveau dispositif basé sur la combinaison d'une adsorption d'albumine à une hémodialyse à haut flux après la filtration sélective de l'albumine sur un filtre spécifique (AlbuFlow) [114]. Ce système peut être appliqué dans les cas de décompensation, d'insuffisance chronique, d'encéphalopathie hépatique, de prurit cholestatique, de syndrome hépatorénal, d'hépatite alcoolique aiguë, d'intoxication aux médicaments ou aux champignons, d'insuffisance hépatique aiguë et dans l'attente de transplantation hépatique [115, 116].

➤ **Le foie bio-artificiel**

Ce procédé intègre que le foie n'est pas uniquement un filtre, mais principalement un organe de synthèse et de métabolisme, contrairement aux systèmes d'hémofiltration qui ne sont malheureusement pas capables de diminuer le taux de mortalité chez les patients ayant une insuffisance hépatique [117]. Le but du foie bio-artificiel est d'assurer les fonctions de détoxification et de synthèse hépatique en utilisant une combinaison de procédures physiques, chimiques et des cellules hôtes bioréactives [118]. Le sang du patient est alors épuré sur une membrane d'hémodialyse semi-perméable contenant dans l'espace extra-capillaire, des hépatocytes [109]. La limite de cette approche réside en l'obtention d'un nombre suffisant d'hépatocytes humains de bonne qualité étant donné que les hépatocytes humains primaires sont difficiles à maintenir en culture et perdent progressivement leurs fonctions métaboliques. L'utilisation des hépatocytes provenant de foie tumoral ou de foie d'hépatopathie virale présente un risque et les greffons non transplantés sont généralement de mauvaise qualité. Des lignées cellulaires comme les cellules Hep G2, lignée humaine d'hépatocytes tumoraux dérivée d'un hépatoblastome, ont été utilisées pour l'homme [119, 120]. Les résultats n'ont pas été concluants probablement en raison de la faible fonctionnalité de ces cellules. Deux autres techniques ont été développées par Démétriou [121] et par Gerlach [122] et consistent à utiliser

des hépatocytes de porc. Une autre technique a utilisé des hépatocytes immobilisés sur des membranes recouvertes de billes d'alginate et placées dans un bioréacteur [123, 124]. Les essais de cette technique chez le porc ont montré une amélioration significative des signes d'hépatite fulminante ce qui pourrait être prometteur dans le traitement de l'insuffisance hépatique aigüe chez l'homme [125, 126]. Cependant, la limitation de cette technique réside dans la formation de xéno-anticorps ainsi que dans le risque de transmission virale du rétrovirus porcin endogène.

En France, L'équipe du Pr D. Samuel [127] a évalué un foie bio-artificiel HepatAssist2000 chez des patients atteints d'hépatite fulminante inscrits sur liste d'attente urgente. Le plasma du patient passait à travers un filtre à charbon puis à travers un filtre à fibres capillaires contenant des hépatocytes de porc. Une amélioration de l'état neurologique des malades traités ainsi qu'une diminution du taux sanguin de bilirubine et des transaminases ont été constatées.

Sur la base des essais réalisés en clinique, le foie bio-artificiel reste plutôt un outil temporaire permettant de stabiliser le patient durant la phase d'altération aigüe (Tableau 8).

Tableau 8. Essais comparatifs randomisés sur l'efficacité des foies artificiels et les foies bioartificiels [118]

Liver assist device	Number of patients	Inclusion criteria	Treatment	Clinical results	Authors
Liver Dialysis	56	A-on-C LF ALF	Liver Dialysis vs SMT	Improved neurological status and MAP Increased degree of bleeding in patients with active bleeding and DIVC	Ash <i>et al</i> ^{11, 22}
MARS	70	HE grade 3 or 4	MARS (6 h per day, 5 days) + SMT or SMT alone	Higher, earlier and more frequent improvement of HE compared to SMT	Hassanein <i>et al</i> ⁴³
	18	A-on-C LF due to alcohol abuse	MARS (four sessions of 8 h, 7 days) + SMT or SMT alone	Improvement of HE Unchanged MAP and renal function No significant change in plasma cytokines and ammonia levels	Sen <i>et al</i> ⁶⁴
	27	Hypoxic liver failure after cardiogenic shock Bilirubin levels greater than 8 mg/ml	MARS (three consecutive sessions at least) vs SMT	Improved survival	El Banayosy <i>et al</i> ⁶⁵
	18	A-on-C LF Alcoholic cirrhosis and superimposed alcoholic hepatitis	MARS + SMT or Prometheus + SMT or SMT alone – three consecutive days (6 h sessions)	Decreased serum bilirubin levels Improvement in MAP and SVRI Reduction of the hyperdynamic circulation	Laleman <i>et al</i> ⁶⁶
	24	Decompensated cirrhosis Bilirubin greater than 20 mg/dl not responding to prior SMT	MARS (2 weeks, up to 10 sessions) + SMT vs SMT alone	Improved 30-day survival Decrease in plasma bile acids and bilirubin Improvement in renal dysfunction and HE	Heermann <i>et al</i> ⁶⁷
Prometheus	24	Decompensated cirrhosis	Single 6 h treatment with Prometheus (study group), MARS or haemodialysis	No differences in systemic haemodynamics No improvement in MAP No adverse effects Decrease in platelet count	Dethloff <i>et al</i> ⁶⁸
	18	A-on-C LF Alcoholic cirrhosis and superimposed alcoholic hepatitis	MARS + SMT or Prometheus + SMT or SMT alone – three consecutive days (6 h sessions)	Decreased serum bilirubin levels (more effective than MARS) No improvement in MAP, SVRI and hyperdynamic circulation	Laleman <i>et al</i> ⁶⁶
HepatAssist	171	Fulminant or subfulminant hepatic failure and primary non-function following liver transplantation	HepatAssist (6 h daily) + SMT vs SMT alone	Improved survival at 30 days (71% vs 62%). Good safety	Demetriou <i>et al</i> ⁶⁹
ELAD	24	Acute liver failure with potentially recoverable lesion or fulfilment of criteria for transplantation	ELAD (median period of 72 h) vs SMT	Good biocompatibility DIVC or hypersensitivity reaction (2 cases) Survival comparable to SMT Better indices of prognosis required	Ellis <i>et al</i> ⁷⁰
BLSS	None conducted yet				
AMC-BAL	None conducted yet				
MELS	None conducted yet				

A-on-C LF, acute-on-chronic liver failure; ALF, acute liver failure; AMC-BAL, Academic Medical Center – Bioartificial Liver; BLSS, Bioartificial Liver Support System; DIVC, disseminated intravascular coagulation; ELAD, Extracorporeal Liver Assist Device; HE, hepatic encephalopathy; MAP, mean arterial pressure; MARS, Molecular Adsorbent Recirculating System; MELS, Molecular Extracorporeal Liver Support; SMT, standard medical therapy; SVRI, systemic vascular resistance index.

➤ Autres approches

D'autres approches ont été explorées comme :

- le foie extracorporel animal. Le sang du patient circule à travers le foie entier d'un porc [128].

Ceci peut entraîner l'arrêt de fonctionnement du foie de l'animal au bout de 6 à 7 heures. Cependant, cette approche entraîne une amélioration neurologique transitoire [129]. Une hypotension artérielle et une thrombopénie ont été observées. Cette technique reste limitée par la nécessité d'avoir plusieurs animaux d'élevage scientifique par patient ce qui rend difficile l'obtention des critères acceptables de sécurité sanitaire et le risque de zoonose est important.

- La xénogreffe désigne la transplantation d'un greffon (un organe ou un tissu) dont le donneur est d'une espèce différente de celle du receveur. Ce type d'intervention pourrait être envisagé pour suppléer la pénurie de greffons humains bien que cela présente des contraintes immunologiques, physiologiques, infectieuses et éthiques non négligeables. L'obstacle majeur de cette technique est le rejet vasculaire de la xénogreffe au bout de quelques jours à plusieurs semaines après transplantation [130]. Cette technique a progressé comme le montrent les travaux de l'équipe de Thomas Strazl à Pittsburgh qui a utilisé des greffons de babouin [131-134] et l'équipe de Makowaka à Los Angeles qui a utilisé un greffon de porc [135]. Toutefois, ces cas isolés n'ont pas pu démontrer l'efficacité de cette approche sans oublier les risques de zoonose qui peuvent survenir [136, 137]. Malgré ces contraintes, une transplantation d'hépatocytes de porc a eu lieu par l'équipe de Fox aux États Unis. Les hépatocytes de porc ($1,6 \times 10^9$) ont été injectés en intra-splénique chez un malade de 56 ans qui est décédé d'une complication septique [138]. Le porc pourrait être une source importante de tissus et de cellules si les problèmes d'ordre immunologique associés à la xénogreffe sont résolus [139]. La transplantation d'organes provenant de porcs génétiquement modifiés chez les primates présente en plus des limitations de développement d'une microangiopathie thrombotique du greffon ou une coagulation intravasculaire disséminée [140]. Des solutions sont en cours de développement et ceci en insérant plusieurs gènes humains thromborégulateurs ou anti-inflammatoires chez les porcs [139].

Le recours à la transplantation hépatique a transformé le pronostic de l'insuffisance hépatique.

La réanimation de cette pathologie vise à assurer une prise en charge symptomatique des différentes défaillances d'organe associées afin de permettre d'attendre la récupération spontanée de la fonction hépatique ou bien d'amener le patient à la transplantation dans les meilleures conditions. Mais, malgré les progrès majeurs réalisés ces 20 dernières années, le manque d'organe à transplanter ne permet pas de répondre aux besoins et la transplantation hépatique reste une procédure lourde à fort taux de complication.

1.4.4 La transplantation d'hépatocytes

Les faits exposés au paragraphe précédent mettent en lumière le besoin crucial de développer de nouvelles solutions thérapeutiques. L'approche de la thérapie cellulaire pourrait être une solution étant donné que les cellules à transplanter, en étant fonctionnelles, apporteraient les fonctions hépatiques déficientes permettant au moins de stabiliser le patient durant la phase d'attente du greffon. Le rationnel de l'évaluation du potentiel thérapeutique de cette approche pour le traitement des maladies hépatiques va être détaillé dans les chapitres suivants.

1.5. La régénération hépatique

1.5.1. Définition

La régénération est la possibilité de restauration de la masse tissulaire et de la fonction après insuffisance hépatique ou après résection partielle. Le foie est caractérisé par cette capacité fascinante en comparaison aux autres organes vitaux. Bien que le concept de "régénération" soit très répandu dans la littérature, la régénération du foie est principalement un processus d'hyperplasie compensatoire, qui est régi plus par des besoins fonctionnels que par des besoins anatomiques [51]. En effet, l'anatomie du foie n'étant pas restaurée, il ne s'agit pas d'une régénération *ad integrum* mais d'une hypertrophie ou une croissance compensatoire des parties résiduelles [141-144].

La régénération du foie est un processus, englobant à la fois l'hypertrophie (augmentation de taille de la cellule ou de la teneur en protéines dans la phase pré-replicative) et une hyperplasie (augmentation du nombre de cellules). Ces deux événements peuvent avoir lieu indépendamment l'un de l'autre. Par exemple, l'hyperplasie peut être associée soit à l'hypertrophie soit à l'atrophie de cellules et l'augmentation de la masse du foie après régénération peut être due uniquement à l'élargissement ou simplement au gonflement de la cellule réticulo-endothéliale ou de l'espace interstitiel [51].

La connaissance de la capacité du foie à régénérer, donc à réajuster son volume optimal avec la taille de l'individu, n'est pas récente. Elle fait même partie de notre mythologie puisque dès l'Antiquité elle était mentionnée par Eschyle à travers la punition infligée au Titan Prométhée par Zeus. Prométhée qui, par ruse, avait volé les secrets des dieux (le feu, la civilisation et la connaissance des arts) pour les transmettre aux hommes (figure 15), fut enchaîné par Héphestos à un rocher au sommet du Mont Caucase, exposé aux rayons brûlants du soleil et où un aigle lui dévorait le foie le jour avant de s'envoler, repu, à la tombée de la nuit. Selon le mythe, le foie régénérerait en une nuit seulement, renouvelant ainsi de jour en jour le calvaire du supplicié, jusqu'à ce qu'Hercule le délivre de nombreuses années plus tard [145].



Figure 15 : Représentation de la légende antique de Prométhée emportant le feu sacré de l'Olympe (par Jean Cossiers 1600-1671) et condamné par Zeus à avoir le foie dévoré chaque nuit (Pierre Paul Rubens 1577-1640).

Dans des circonstances normales, le foie humain initie sa régénération en 3 jours et récupère une taille normale en 3 mois. Dans la plupart des cas, les fonctions hépatiques sont normalisées en 2 à 3 semaines après hépatectomie partielle ou dans les cas de guérison spontanée suite à une hépatite fulminante [141]. Chez le rat, une hépatectomie de 70 % de la masse hépatique s'accompagne d'une récupération intégrale en 7 à 10 jours [146]. Sur un foie au repos, on observe très peu de mitoses spontanées dans les hépatocytes murins (environ 1 mitose pour 20 000 cellules) [147]. Après hépatectomie, chaque hépatocyte peut se diviser 1 à 2 fois permettant ainsi la récupération de la masse hépatique. On a pu réaliser jusqu'à 12 hépatectomies itératives et observer une régénération sans aucun problème [148, 149]. Ainsi un seul hépatocyte pourrait se diviser de façon itérative pour former environ 50 foies complets. Cette capacité de régénération semble complexe et correspondrait plutôt à une capacité

d'adaptation du foie à son environnement. En effet, la pratique de la transplantation hépatique a permis de mettre en évidence que le foie d'un gros chien transplanté chez un petit chien diminue de taille pour se conformer à son nouvel environnement [150]. Ceci montre l'existence de mécanismes de régulation de la croissance hépatique pour que la taille de ce viscère s'adapte parfaitement à son hôte.

Les études de la régénération du foie chez les êtres humains présentent des difficultés insurmontables en raison de l'hétérogénéité des étiologies lésionnelles responsables du processus, sans compter les raisons d'ordre éthique. Les modèles *in vitro* se révèlent difficilement exploitables vu les difficultés pour reproduire la structure complexe du foie et de ses voies de transmission de signaux. Ainsi, la régénération du foie a été explorée sur des modèles animaux avec, à la disposition du chercheur, un large éventail de modes d'induction de la régénération hépatique, par exemple, une hépatectomie partielle ou l'utilisation de substances chimiques (figure 16).

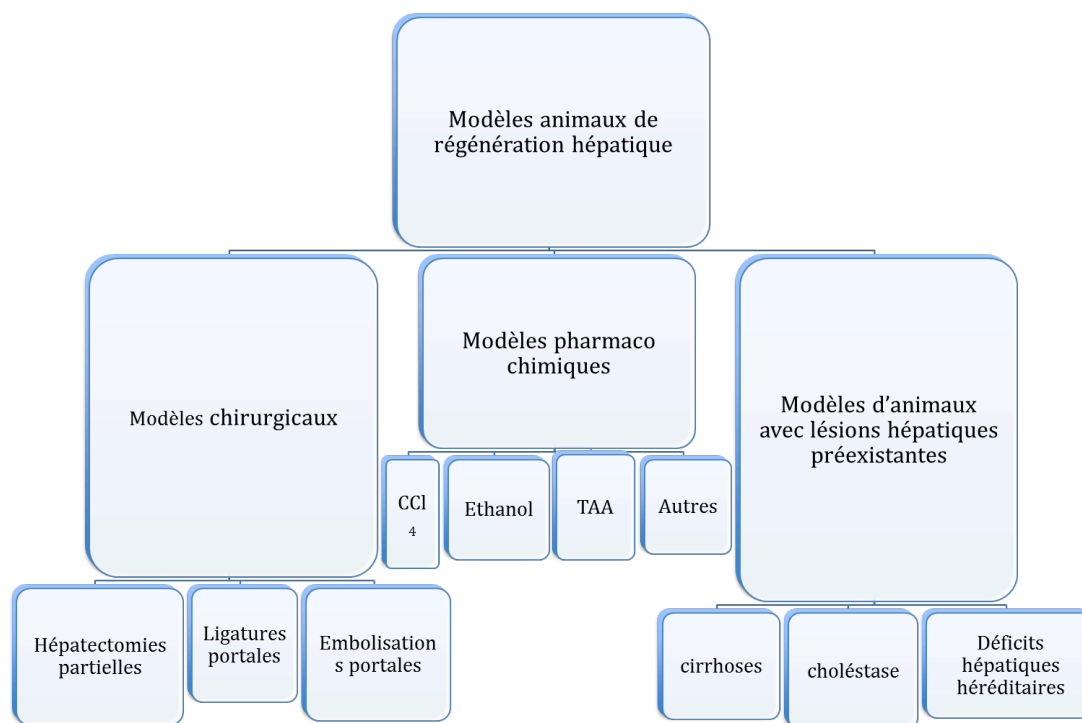


Figure 16 : Modèles animaux de régénération hépatique [51].

La plupart de nos connaissances actuelles sur la régénération du foie ont été l'œuvre des études réalisées chez le rat après hépatectomie des 2/3. Le procédé de régénération hépatique se décompose en une première étape avec un " amorçage " des hépatocytes, c'est-à-dire, qu'ils acquièrent une meilleure capacité à se répliquer. Elle est suivie d'une phase de prolifération dans laquelle une masse cellulaire suffisante est atteinte. Puis une étape de « terminaison » durant laquelle la cellule acquiert sa fonctionnalité [151]. La prolifération des hépatocytes commence dans la région périportale après un intervalle de 24 h, continue vers la région péricentrale après 36 à 48 h. Après environ 3 jours, on retrouve des amas d'hépatocytes immatures qui sont disposés le long des voies vasculaires. L'invasion de ces hépatocytes commence environ 48 h après l'hépatectomie. Après sept jours, l'aspect lobulaire du foie est rétabli, même s'il est temporairement surdimensionné [141].

En pratique clinique, cette régénération hépatique est observée dans les situations de souffrance et reste ponctuelle. En général, la prolifération des hépatocytes *in vivo* est un événement rare (le taux de mitose est d'environ 1/20 000) c'est-à-dire qu'environ 1% des hépatocytes sont en mitose en situation normale alors qu'en phase de régénération optimale, c'est 95 % [152]. Cette activation passe en premier lieu et immédiatement après la résection ou stimulation hépatique par des facteurs endothéliaux [153, 154].

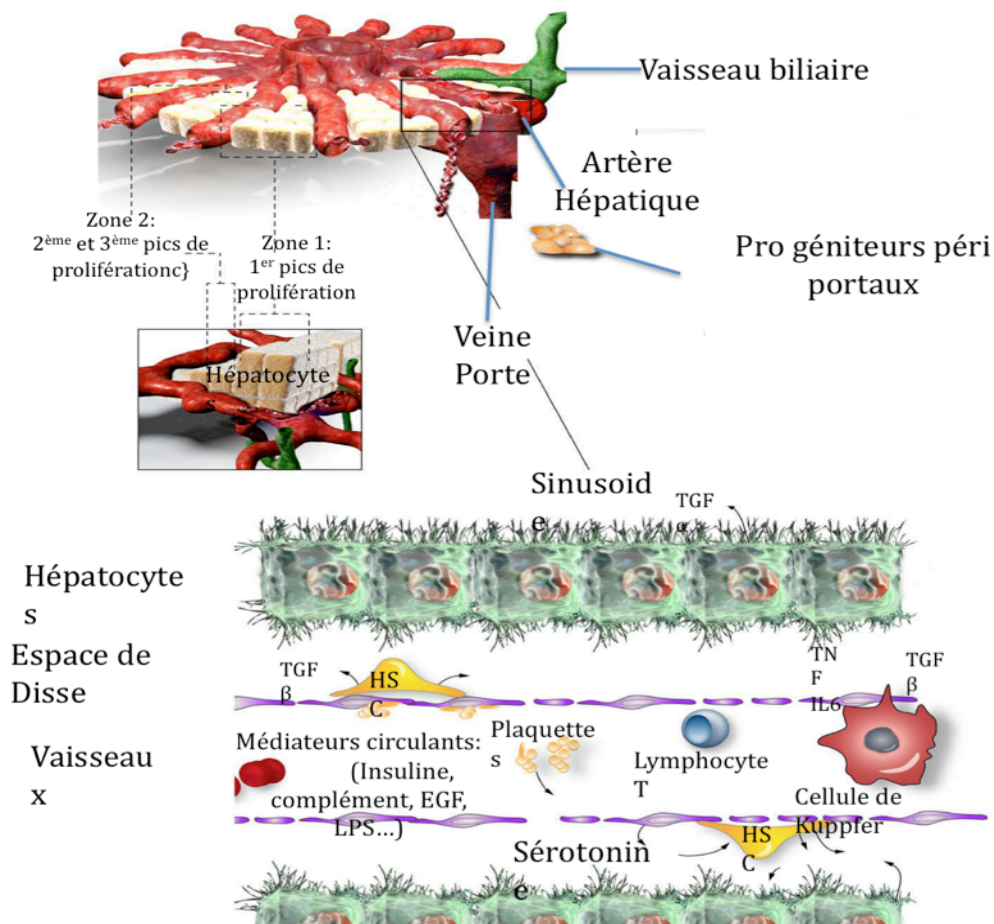


Figure 17 : Schématisation des mécanismes de régénération au sein du foie [144].

1.5.2 Mécanismes régénératifs du foie sain

La régénération hépatique est actuellement vue sous un regard neuf à la lumière des récentes innovations techniques. Même si le modèle d'hépatectomie partielle (HP) reste la référence [144, 146], l'utilisation des nouvelles techniques expérimentales a non seulement conduit à une réaffirmation des principes de base de la régénération décrites initialement par Nancy Bucher et son équipe [155] mais aussi met en avant de nouvelles questions.

L'étude de la régénération hépatique après HP a fourni une compréhension plus approfondie des mécanismes de prolifération cellulaire *in vivo*, et peut fournir une explication moléculaire dans l'auto-renouvellement indéfini du foie, une propriété souvent attribuée exclusivement aux cellules souches [144, 156]. Les hépatocytes semblent être des cellules autonomes pour décider

de leur réplication. Ce concept est basé sur un amalgame de travaux et a été bien illustré par Weglarz et Sandgren [157]. Ainsi après HP des 2/3 l'hépatocyte de souris se divise en 40h alors de celui de rat met 24h. Chaque hépatocyte maintient sa propre cadence proliférative malgré des conditions endocriniennes et paracrines similaires. Ces résultats sont complétés par une récente étude de Wu et al., dans laquelle les injections séquentielles d'analogues de nucléotides marqués ont été utilisés pour déterminer la cinétique génétique de la prolifération des hépatocytes dans différentes zones du foie [158]. Les auteurs ont montré qu'il existe trois pics de synthèse d'ADN après HP, d'abord dans la zone 1 au contact des veinules présinusoidales, puis dans les zones en direction de la veine centrolobulaire (figure 18). Il est intéressant de remarquer que 15% des hépatocytes préexistants ne se diviseront jamais après HP, tandis que 11% le feront au moins trois fois [144, 158]. Si ce phénomène est dû à la proximité des nutriments portes, au contact avec des cellules spécifiques non parenchymateuses, à l'hémodynamique artério-veineuse, ou à des événements purement intracellulaires, les mécanismes précis sont encore inconnus.

Il semble que l'expansion d'une population de cellules progénitrices pendant la régénération normale dans le cadre de l'homéostasie du foie, c'est-à-dire «hypothèse du foie streaming» soit remise en cause [159]. Willenbring et ses collègues ont récemment abordé cette question en développant un moyen d'exprimer de manière stable une protéine fluorescente jaune (EYFP) dans les hépatocytes adultes [160]. Ils ont pu ainsi réaliser une cartographie des hépatocytes analysés sur la durée, et confirmer que les hépatocytes adultes sont la source des nouvelles cellules au cours de l'homéostasie hépatique normale. Ils ont aussi constaté que, après HP, la grande majorité (99%) des nouveaux hépatocytes venait d'hépatocytes adultes pré-existant, confirmant que les cellules progénitrices ne jouent pas un rôle important dans l'homéostasie du foie normal et au cours de la régénération [143, 160, 161]

Les cellules progénitrices souches hépatiques joueraient un rôle important dans la restitution de la masse hépatique lors de lésions de plus grande envergure ou de grandes résections hépatiques, avec inflammation chronique diffuse ou fibrose diffuse du foie [162].

En plus des signaux hépatocytaires autonomes (figure 18) et endocriniens, des facteurs paracrines sont essentiels à la régénération normale [163]. D'importants travaux ont porté sur le rôle du microenvironnement hépatique, c'est-à-dire la matrice extracellulaire (MEC), dans l'homéostasie du foie et la régénération [143, 146, 163]. Des études récentes ont même mis l'accent sur le rôle de l'endothélium comme stimulant de la prolifération des hépatocytes normaux d'où la nécessité de rétablir ou de conserver une vascularisation fonctionnelle pour optimiser la régénération hépatique [152, 153]. Les autres cellules non parenchymateuses, comme les cellules de Kupffer, les cellules stellaires et les lymphocytes intrahépatiques fournissent également des signaux intervenant pendant la régénération des hépatocytes [162], (figure 18). Il semble probable que ces interactions intercellulaires soient encore plus cruciales au cours de la régénération dans le foie lors de micro-altérations comme l'embolisation ou l'augmentation du flux portal [144, 163, 164]. En effet, la stéatose, l'inflammation et la fibrose réduisent la capacité d'auto-renouvellement des hépatocytes. Dans des expériences visant à évaluer le rôle d'un microenvironnement anormal affectant la fonction hépatique dans la prolifération des hépatocytes, Liu et al ont isolé des hépatocytes primaires de rats normaux et de rats avec cirrhose compensée ou décompensée [165]. Ils ont ensuite effectué des expériences de repeuplement avec ces cellules sur des rats cirrhotiques, et montré que les hépatocytes de rats normaux ou cirrhotiques compensés ont été immédiatement en mesure de greffer et proliférer dans le microenvironnement cirrhotique. Fait intéressant, les hépatocytes de rats atteints de cirrhose décompensée n'ont pas proliféré et n'ont retrouvé leurs fonctionnalités qu'après deux mois.

Les mécanismes de régénération hépatique semblent encore imparfaitement évalués faisant intervenir tous les acteurs cellulaires du foie, le microenvironnement ainsi que des éléments vasculaires et fonctionnels (flux portal).

Quoi qu'il en soit, la régénération se fait à partir des hépatocytes restant qui se divisent de façon itérative. Les hépatocytes quiescents sont en phase G_0 . Le *TNF α* (*Tumor Necrosis Factor alpha*) et l'IL6, sécrétés par les cellules non hépatocytaires, permettent de faire entrer l'hépatocyte dans le cycle cellulaire. Il existe au moins 70 gènes différents qui sont activés rapidement après l'hépatectomie. Ces gènes constituent les *immediate early genes* dont les protéines correspondantes sont très variées (facteurs de transcription, tyrosine phosphatase, protéines sécrétées, protéines cellulaires....). Il faut noter particulièrement deux facteurs de transcription qui possèdent des cinétiques de sécrétion bien définies: NF κ B et STAT3.

- **NF κ B** (pour *Nuclear Factor for the κ chain of B cells*) est activé 30 minutes après l'hépatectomie et ceci pendant 4 à 5 heures.
- **STAT3** est activé 1 à 2 heures après l'hépatectomie et ceci pendant 4 à 6 heures.

La deuxième étape consiste en l'activation de gènes dits *delayed early genes* qui codent pour des facteurs anti-apoptotiques (comme par exemple, le facteur β cl-XL), puis agissent sur des gènes contrôlant le cycle cellulaire (p53, mdm2, p21, cycline, cdk). Enfin, des facteurs de croissance prennent le relais (HGF ou *Hepatocyte Growth Factor* qui est synthétisé par le poumon, la rate et la cellule de Ito et qui a une action paracrine ou endocrine) et TGF β (qui a une action autocrine). Ces facteurs de croissance ne peuvent agir que si la cellule hépatique est recrutée suite à l'hépatectomie sinon ils sont inefficaces. Ces facteurs jouent donc un rôle de contrôle exogène sur la régénération du foie, ce qui permet l'adaptation de la taille du foie à son nouvel environnement.

La dernière étape est l'arrêt de la prolifération assurée par le TGF β 1.

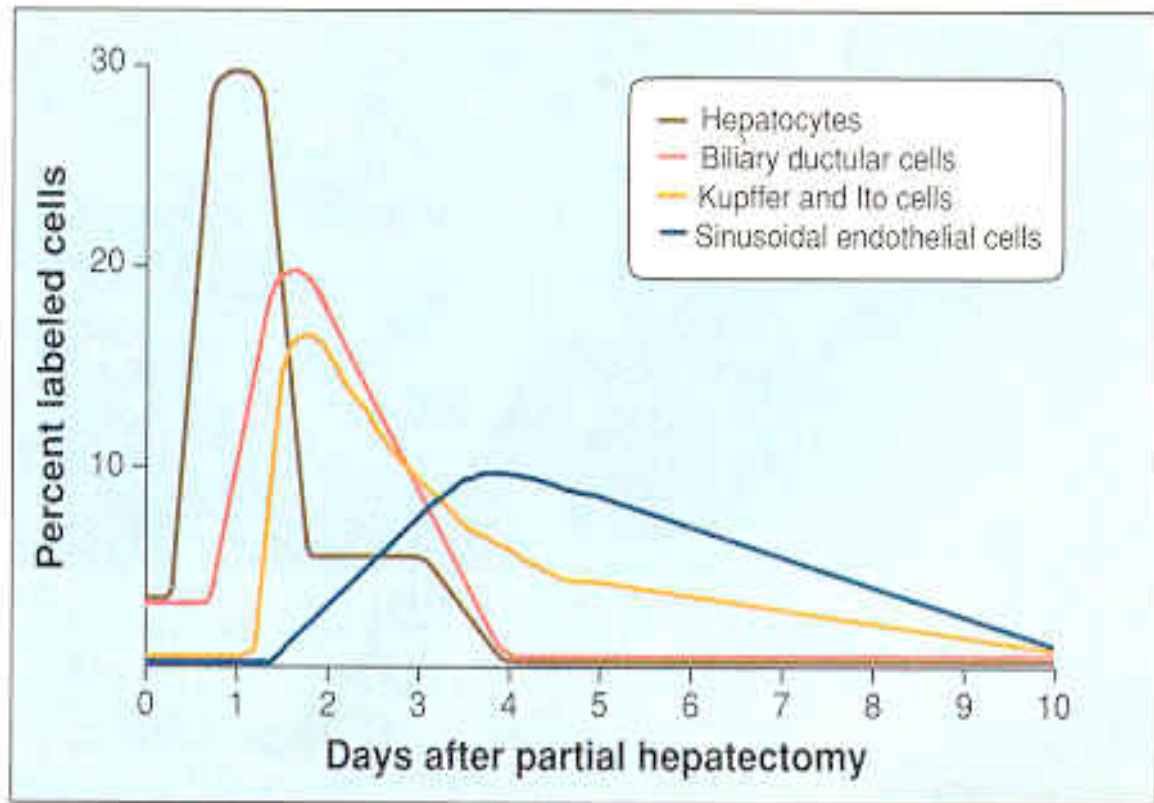


Figure 18 : Cinétique de la synthèse d'ADN dans différents types cellulaires dans un modèle murin, après hépatectomie partielle (extrait de Michalopoulos G.K., DeFrances M.C. 1997) [147].

1.5.3 Mécanismes régénératifs du foie malade

Sur foie pathologique, les hépatocytes ne peuvent répondre correctement entraînant un recrutement de la cellule ovale qui est considérée comme une cellule souche hépatique. Elle est située dans le canal de Hering entre la travée d'hépatocytes et le canalicule biliaire. Quoiqu'il en soit la phase de régénération altère les capacités fonctionnelles du foie [144].

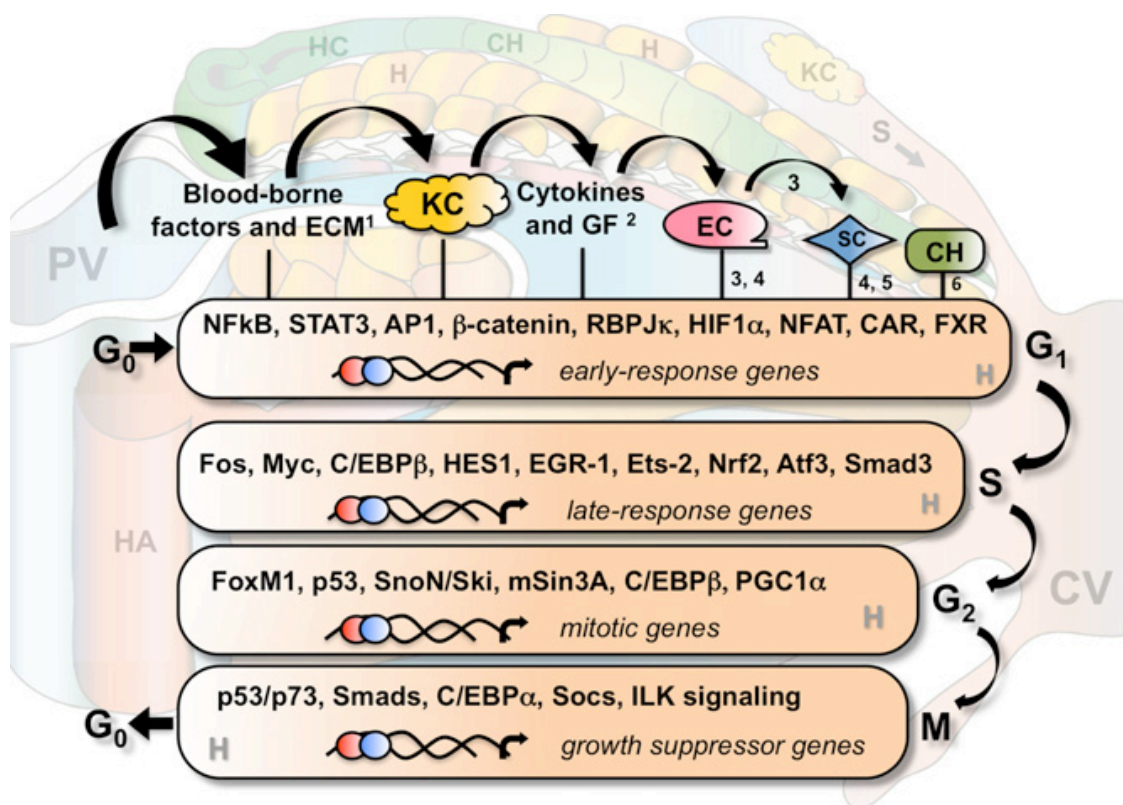


Figure 19: Cascades de transcription au cours de la régénération du foie.

La progression de la régénération du foie est médiée par les stades du cycle cellulaire (G0: à gauche; G1, S, G2, M: à droite) avec dans un premier temps, les activités des facteurs de transcription et l'expression des gènes dans les hépatocytes (H), comme cela est décrit dans les encadrés du premier plan, interviennent aussi les éléments structurels comme les vaisseaux hépatiques (Veine portale PV; conduit biliaire BD; Veine centrale CV; Artère hépatique HA; canal de Hering HC; sinusoiide S; matrice extracellulaire ECM), schématisés en arrière-plan. Ses mécanismes sont réglés par des régulateurs induits (LPS1, ICAM, facteurs du complément, insuline, acétylcholine, noradrénaline, EGF, xénobiotiques; l'IL6 et le TNF α ; 3: VEGF; 4: HGF; 5: TGF β ; 6: acides biliaries) Ils sont sécrétés par des cellules non parenchymateuses du foie (cholangiocytes CH; cellules endothéliales CE; Cellules de Kuppfer KC; cellules stellaires SC). Ces régulateurs jouent des rôles spécifiques dans l'induction de la cascade transcriptionnelle pendant la régénération du foie [166].

1.5.4 Marqueur cellulaire de régénération : Ki67

La protéine Ki-67 (également connue sous le nom de « antigène identifié par l'anticorps monoclonal Ki-67 » ou MKI67) est un marqueur cellulaire de la prolifération en général. Il est strictement associé à la prolifération de cellules. Pendant l'interphase, l'antigène Ki-67 peut être exclusivement détecté dans le noyau des cellules, tandis que lors de la mitose la majeure partie de la protéine est replacée à la surface du chromosome. La protéine Ki-67 est ainsi présente pendant toutes les phases actives du cycle cellulaire (G1, S, G2, et mitose), mais est absent des cellules au repos (G0). Ki-67 est donc un excellent marqueur pour déterminer la fraction de croissance d'une population donnée de cellules. La fraction de Ki-67-positif dans les tumeurs cellulaires (Index *Ki-67*) est souvent corrélée avec l'évolution clinique des cancer. Ainsi les exemples les plus étudiés sont les cancers de la prostate et du sein. Pour ces tumeurs, la valeur pronostique du Ki67 sur la survie et la récurrence tumorale a été prouvée à plusieurs reprises [167, 168].

A l'origine cette protéine a été définie par un prototype monoclonal d'anticorps anti-Ki-67, qui a été produit en immunisant des souris avec des noyaux de lymphome de Hodgkin, variété de cellules L428. Le nom est dérivé de la ville d'origine de l'équipe ayant mis au point ce protocole (Kiel) et le nombre de clones originaux dans la boîte à 96 puits [169].

MIB-1 est l'anticorps monoclonal utilisé généralement pour détecter l'antigène Ki-67. Il est employé dans les applications cliniques pour déterminer l'*Index Ki-67 marquant*. Un de ses avantages primaires par rapport à l'anticorps Ki-67 original (et à la raison pour laquelle il a essentiellement supplanté l'anticorps original pour l'usage clinique), c'est qu'il peut être employé sur les sections incorporées en paraffine ou fixées en formaline [170].

1.6. Pourquoi la transplantation d'hépatocytes?

1.6.1. Généralités

La transplantation d'hépatocytes est une technique de thérapie cellulaire qui pourrait être une alternative intéressante dans le traitement des maladies métaboliques héréditaires hépatiques (MMHH). La transplantation hépatique, seul traitement curatif actuellement disponible, est en effet limitée par une pénurie de greffons, des complications chirurgicales spécifiques, et impose un traitement immunosuppresseur à vie. Par contre, la transplantation d'hépatocytes a pour but de remplacer les hépatocytes natifs déficients par des hépatocytes normaux ou corrigés. En effet, dans les pathologies métaboliques héréditaires hépatiques, le foie a une anatomie normale mais la fonction des hépatocytes est altérée. Il suffirait de corriger ce désordre métabolique par la reconstitution de 5% de la masse hépatocytaire totale. Quoi qu'il en soit, en cas d'échec, une transplantation hépatique peut toujours être réalisée.

Introduite dans les années 90, la thérapie cellulaire hépatique, s'affirme de plus en plus comme une alternative prometteuse à la transplantation orthotopique du foie. Cette nouvelle approche est donc séduisante en tous points avec notamment un faible risque de morbidité et de mortalité car le patient n'a pas besoin de subir d'ablation/remplacement d'organe [171].

Deux approches sont possibles:

- Allogénique : une allotransplantation d'hépatocytes normaux d'un donneur dans le foie malade du receveur
 - Autologue : autotransplantation d'hépatocytes du patient, génétiquement modifiés *ex vivo* pour restaurer un phénotype normal.

La transplantation hépatocytaire présente plusieurs avantages par rapport à la transplantation d'organes, surtout pour le traitement des MMHH où les thérapeutiques précédemment décrites sont souvent contraignantes (Figure 20). Il s'agit d'une technique plus simple et moins invasive, car les cellules pourraient être injectées via des cathéters par la veine mésentérique supérieure

ou inférieure directement dans le système porte du malade [172]. Elle pourrait aussi être répétée si nécessaire [173, 174] ou également prolonger les délais d'attente de greffon hépatique pour les patients en attente de transplantation. Les hépatocytes peuvent être cryopréservés et donc être disponibles à la demande dans les cas d'allotransplantation [175, 176]. La transplantation d'hépatocytes isolés pourrait pallier la pénurie de greffons car un même donneur pourrait donner des hépatocytes à plusieurs receveurs [177]. Dans le cas d'hépatocytes génétiquement modifiés, ceux-ci peuvent être génétiquement modifiés *in vitro* afin d'exprimer des fonctions spécifiques. Enfin, la thérapie cellulaire serait associée à une faible morbi-mortalité et à un plus faible coût que la transplantation hépatique [175, 178]. Des succès récents ont été obtenus par transplantation de ces cellules et laissent présager que la thérapie cellulaire sera une orientation thérapeutique d'avenir [178-181]. Par ailleurs, outre les applications cliniques, sur un plan fondamental, le repeuplement hépatique par transplantation hépatocytaire a permis de mieux comprendre le fonctionnement hépatique [173, 180, 182, 183].

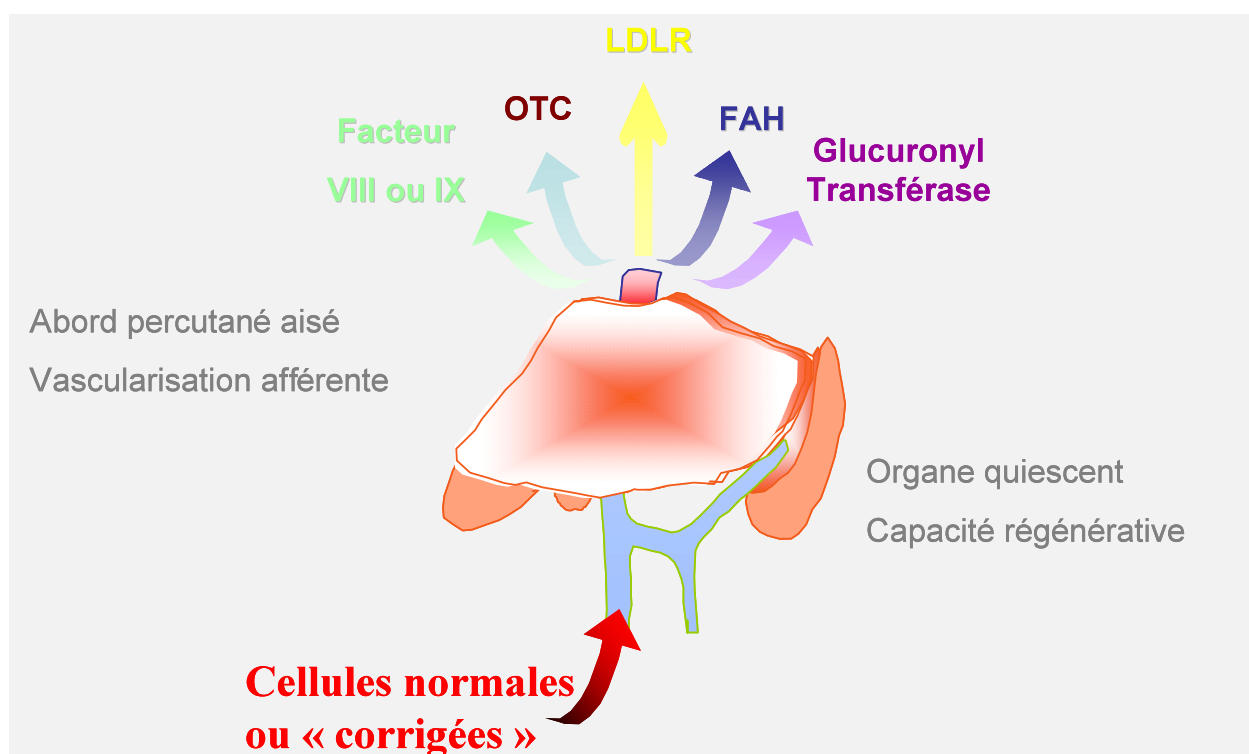


Figure 20 : La thérapie cellulaire pour les MMHH {Lainas, 2012 #2250}.

1.6.2. Historique

Depuis près de 40 ans, plusieurs études sur le petit animal ont montré que la transplantation d'hépatocytes pouvait améliorer les désordres métaboliques, mais de façon insuffisante ou transitoire. Dès 1976, des auteurs ont montré que l'on pouvait obtenir après allotransplantation d'hépatocytes, une diminution du taux de bilirubine chez le rat Gunn dans le modèle de la maladie de Crigler Najjar (déficit en glucuronyltransférase responsable d'un défaut de conjugaison de la bilirubine) [184]. De même, chez le lapin Watanabe, modèle de l'hypercholestérolémie familiale (défaut de récepteurs aux LDL), l'injection d'hépatocytes autologues modifiés génétiquement a permis de faire chuter le taux de cholestérol [185].

Néanmoins, les résultats de plusieurs essais réalisés chez des patients atteints de maladie métabolique héréditaire ont été décevants [186-189]. En 1994, 5 patients atteints d'hypercholestérolémie familiale ont été traités par autotransplantation d'hépatocytes isolés à partir d'une lobectomie gauche et transduits avec un vecteur rétroviral porteur du gène codant pour le récepteur aux LDL. Il n'y a pas eu de réel bénéfice clinique et l'essai a été interrompu [187]. Pour expliquer ces résultats insuffisants, les mécanismes d'intégration et de prolifération des cellules transplantées ont été étudiés. Il a été montré que la principale limite à l'efficacité de la transplantation d'hépatocytes était le faible pourcentage de la masse hépatique saine reconstituée par les hépatocytes transplantés [180]. En effet, dans des conditions standard, chez le petit animal, les résultats en terme de pourcentage de foie repeuplé après transplantation d'hépatocytes se limitaient à 0,5% [190]. Par ailleurs l'intégration des hépatocytes dans les travées hépatocytaires chez le rat déficient en dipeptidyl peptidase IV (marqueur des canalicules biliaires) reste très faible [191]. Dans ce modèle, 70% des hépatocytes transplantés étaient piégés dans les espaces portes où ils étaient phagocytés par les cellules de Küpffer dès les premières heures après la transplantation. Moins de 1% des hépatocytes était finalement intégrée au parenchyme hépatique.

Différentes approches permettant de favoriser la prise de greffe ont été étudiées, utilisant notamment les animaux transgéniques. Dans le modèle de la souris transgénique alb-uPA [192], il y a une surexpression de l'activateur du plasminogène de type urokinase, ce qui a pour conséquence un effet délétère sur les hépatocytes et le décès rapide des souris par des phénomènes hémorragiques. En transplantant chez ces souris des hépatocytes sains, on obtient un taux de repeuplement de 80% grâce à l'avantage sélectif des hépatocytes transplantés normaux sur les hépatocytes natifs. D'autres études ont porté sur la préparation du foie receveur, en créant un « espace physiologique » pour les hépatocytes transplantés par la destruction des hépatocytes natifs par radiothérapie ou au blocage de leur multiplication [193, 194], on obtient une amélioration de la prise de greffe. Enfin, chez le rat, on a montré qu'en présence d'un stimulus de régénération (après une hépatectomie majeure), on observait une amélioration de la prise de greffe en bloquant le cycle cellulaire des hépatocytes natifs par de la rétroirsine (agent alkylant), puisque l'on donnait aux hépatocytes transplantés un avantage prolifératif [195]. Néanmoins, l'ensemble de ces modèles sont restés jusqu'ici dans le domaine expérimental car peu applicables en clinique en raison des risques pour le patient. Jusqu'à ce jour, la prise de greffe d'hépatocyte chez l'homme reste insuffisante.

Les perspectives d'application de la transplantation d'hépatocytes, génétiquement modifiés ou non, sont immenses [175, 178, 196, 197]. Parmi elles figureraient : le traitement des hépatites fulminantes et chroniques ; le traitement de déficits métaboliques d'origine génétique tels que la maladie de Wilson, le déficit en α 1-anti-trypsine, les lipidoses (maladie de Niemann-Pick, maladie de Gaucher), l'amyloïdose familiale et la tyrosinémie héréditaire de type-1, les défauts de la coagulation comme l'hémophilie B (déficit en Facteur IX); et enfin, les déficits métaboliques héréditaires comme l'hypercholestérolémie familiale, le syndrome de Crigler-Najjar de type-1 et le déficit en ornithine transcarbamylase (OTC) qui pourraient être traités par transplantation d'hépatocytes allogéniques ou l'autotransplantation d'hépatocytes

génétiqnement corrigés (thérapie génique).

La thérapie génique des MMHH peut être envisagée selon deux approches :

- La thérapie génique *in vivo*, visant à transférer directement dans les hépatocytes, dans l'organisme, un gène thérapeutique véhiculé par un vecteur viral recombinant ou inerte afin de corriger un déficit chez le patient
- La thérapie génique *ex vivo*, visant à prélever des hépatocytes du foie d'un patient, transférer un gène à l'aide de vecteurs viraux dans ces cellules *in vitro* et les réimplanter ensuite dans l'organisme. Cette approche comporte donc une étape de transplantation d'hépatocytes avec les difficultés et les limites de la technique.

1.6.3. Thérapie génique

Les premiers essais cliniques de thérapie génique ont initialement été restreints à des cas extrêmement graves de maladies hépatiques pour lesquels les alternatives thérapeutiques classiques étaient inefficaces ou inexistantes. La thérapie génique chez l'homme a historiquement débuté avec des vecteurs rétroviraux, dérivés de virus à ARN. L'infection par un rétrovirus implique une étape de rétrotranscription de l'ARN en un fragment d'ADN double brin qui pourra être inséré (étape d'intégration) dans les chromosomes après pénétration dans le noyau cellulaire. Une fois intégré, le génome du rétrovirus sous sa forme ADN est stable et transmis de manière mendélienne comme n'importe quel gène de la cellule. Ils présentent trois avantages: peuvent être produits en l'absence de toutes particules virales sauvages évitant une dissémination incontrôlée du génome recombinant, ne véhiculent donc pas de séquences codantes d'origine virale qui pourraient induire une réponse immune et enfin permettent une intégration stable du transgène dans le génome de la cellule hôte [198]. La principale limitation est la nécessité d'une division cellulaire dans les heures suivant la pénétration de la particule

virale dans la cellule cible [199]. Cette limitation concerne particulièrement les hépatocytes qui sont quiescents dans un foie sain ou non préparé.

Dans cette approche, le vecteur utilisé pour véhiculer et introduire dans les hépatocytes le gène manquant joue un rôle fondamental. Les vecteurs adénoviraux, virus à ADN, font partie des outils de transfert de gène les plus puissants. Ils sont caractérisés par une forte résistance des particules virales et un large spectre d'infection [200]. Ces vecteurs ont été principalement utilisés pour des protocoles *in vivo*. Le taux de transduction avoisine les 100% lorsque l'on cible le foie. Les limites restent l'immunogénicité des adénovirus et l'instabilité de l'expression du transgène [201]. En effet, ces vecteurs ne s'intègrent pas dans le génome de la cellule hôte mais restent sous forme épisomale. Ainsi, le transgène est rapidement perdu dans les cellules en division. En 1999, un essai clinique de phase I pour le traitement de 18 patients atteints d'un déficit en OTC à l'hôpital Universitaire de Pennsylvanie a été brutalement interrompu suite au décès d'un jeune malade de 18 ans [202]. Dans cet essai, l'adénovirus recombinant portant le gène humain de l'OTC était injecté via l'artère hépatique droite pour mieux cibler le foie. Quelques heures seulement après avoir reçu une dose d'adénovirus, ce malade a développé une réponse immune qui a conduit à un choc anaphylactique et une défaillance multiviscérale. Afin de réduire la réponse immunitaire, plusieurs études ont été réalisées avec des vecteurs dérivés de virus adeno-associés (Adeno-Associated Virus, AAV). Ces parvovirus à ADN linéaire ont la particularité de favoriser une intégration de leur génome toujours au même endroit dans le chromosome 19 [203, 204]. Longtemps considérés comme inoffensifs, à l'inverse des vecteurs adénovirus, leur développement et leur utilisation en clinique ont été favorisés depuis quelques années [204-206]. Aujourd'hui, il est possible de produire des AAV recombinants qui semblent être performants pour le transfert de gènes dans les cellules quiescentes comme les hépatocytes [207].

Les lentivirus sont des rétrovirus à génome complexe présentant des similitudes dans leur

structure génétique, le cycle de réplication et les interactions biologiques avec leurs hôtes respectifs [208]. L'utilisation de vecteurs lentiviraux dérivés du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) présente un intérêt car ils peuvent transduire les cellules quiescentes, comme les hépatocytes [209-211]. La mise au point de vecteurs recombinants, inoffensifs et performants développés aujourd'hui, devrait permettre d'augmenter largement le taux de transduction d'hépatocytes humains.

1.6.4. Quelles sont les indications?

La transplantation d'hépatocytes pourrait être une alternative à la transplantation d'organe dans de nombreuses situations cliniques [212]. Les deux principaux groupes d'indications ont été les hépatites fulminantes et les maladies métaboliques héréditaires [171, 213, 214]. Dans les cas d'hépatite fulminante, l'indication a été posée, en absence d'une thérapie alternative, à cause de l'indisponibilité immédiate d'un greffon hépatique. Dans les cas de déficit métabolique du foie, la transplantation hépatocytaire constitue un compromis entre l'irréversibilité de la transplantation d'organes, avec les risques chirurgicaux associés, la nécessité d'une immunosuppression même si elle est très fréquemment utilisée et l'exigence d'une thérapie sûre, simple et efficace [215]. Les exemples les plus étudiés sont les possibilités de traitement:

- le syndrome de Crigler-Najjar: déficit en bilirubine UDP glucuronosyltransférase, UGT1A1, provoquant une accumulation à des taux toxiques de bilirubine non conjuguée dans le plasma et une perte de l'excrétion biliaire de bilirubine [216, 217].
- d'autre part, la maladie de Wilson due à la perturbation du métabolisme du cuivre liée à des mutations dans le gène ATP7b, responsable d'une toxicité hépatique) [218].

1.6.5. État des lieux

➤ Transplantation d'hépatocytes pour insuffisances hépatiques chroniques (Tableau 9)

Les premiers essais cliniques de thérapie cellulaire pour le traitement de l'insuffisance hépatique chronique consistaient en une autotransplantation par injection intrasplénique d'hépatocytes isolés à partir du lobe gauche [219, 220]. D'autres essais cliniques ont évalué une allotransplantation d'hépatocytes isolés à partir de greffons hépatiques sains.

Chez trois enfants, l'injection d'hépatocytes dans la rate ou le foie a permis une réduction significative de l'ammoniémie et l'amélioration clinique de l'encéphalopathie jusqu'à six semaines, en attendant la disponibilité d'un greffon hépatique. Cette procédure a permis le rétablissement complet de deux des trois enfants traités [221]. Chez les adultes, sept patients (un infecté par le virus de l'hépatite C, un atteint d'un déficit en A1AT et cinq avec une cirrhose alcoolique) atteints de cirrhose et une encéphalopathie avancée non contrôlée par traitement médicamenteux, ont subi une allotransplantation d'hépatocytes en intrasplénique [138, 196]. Chez le patient infecté par le virus de l'hépatite C, la présence d'hépatocytes transplantés, formant des structures avec jonctions cellulaires normales, a été observée dans la rate quelques jours après transplantation. L'essai d'allotransplantation d'hépatocytes chez le patient atteint d'un déficit en A1AT n'a pas été concluant car il a subi une transplantation hépatique deux jours après la transplantation cellulaire. Quant aux cinq patients atteints de cirrhose alcoolique, ils ne montraient soit aucun bénéfice thérapeutique attendu jusqu'à 33 jours post-transplantation, soit une réduction significative de l'ammoniémie et de l'encéphalopathie [222]. Le bénéfice thérapeutique obtenu avec la transplantation d'hépatocytes pour le traitement de l'insuffisance hépatique chronique chez l'homme n'est donc pas évident et n'a pas rencontré jusqu'à présent les améliorations cliniques et biologiques obtenues dans les études réalisées chez l'animal [180, 222, 223]. Néanmoins, une amélioration clinique a été observée chez quelques patients mais elle a toujours été transitoire. Une des explications pourrait se trouver

dans la voie d'injection des cellules. En effet, il a été montré que la voie d'administration des hépatocytes influence leur intégration et leur fonctionnement [180, 224]. Ces essais cliniques ont également soulevé plusieurs autres questions, dont la quantité de cellules nécessaires pour observer un effet thérapeutique significatif, le site et la fréquence de transplantation.

Tableau 9 : Maladies hépatiques pour lesquelles un protocole clinique de transplantation d'hépatocytes a été réalisé.

Déficits métaboliques héréditaires
Syndrome de Crigler-Najjar de type I
Hypercholestérolémie familiale
Déficit en facteur VII
Maladie de stockage du glycogène de type I
Maladie de Refsum
Cholestase intrahépatique familiale
Déficit en α_1 -antitrypsine
Déficit du cycle de l'urée
Déficit en OTC
Citrullinémie
Déficit en lyase argininosuccinate
Insuffisance hépatique aiguë (fulminante)
Médicamenteuse
Virale
Idiopathique
Alimentaire
Postopératoire
Insuffisance hépatique chronique
Virale
Alcoolique

Transplantation d'hépatocytes pour l'insuffisance hépatique aiguë

La transplantation d'hépatocytes a été proposée comme un traitement provisoire dans l'attente d'un greffon hépatique. Initialement, cette approche a été réalisée chez des patients atteints d'hépatite fulminante, présentant une encéphalopathie de grade élevé et une défaillance multi-organe en attente de transplantation hépatique [221, 225]. Jusqu'à présent, plus de 30 patients ont été traités à travers le monde pour une insuffisance hépatique aiguë par transplantation d'hépatocytes allogéniques [214]. Dix enfants atteints d'hépatite aiguë d'origine virale, idiopathique ou médicamenteuse ont reçu des injections d'hépatocytes allogéniques, principalement via la veine porte, avec mise en place d'une immunosuppression. Deux des patients pédiatriques ont été en rémission complète sans recours à une transplantation hépatique, alors que pour trois autres cette procédure a permis de pallier avec succès la défaillance hépatique en attendant un greffon [214, 222]. Malgré une défaillance multiviscérale associée à une atteinte hépatique sévère, huit des dix enfants ont manifesté une amélioration nette de leur état clinique [214, 222, 226]. Plus de 20 patients adultes atteints d'hépatites aiguës d'étiologies diverses associées à une défaillance multiviscérale, ont été traités par cette approche [180]. Quelque soit l'étiologie, la transplantation d'hépatocytes allogéniques a permis d'améliorer l'état clinique de la majorité des patients qui attendait un greffon hépatique. Pour certains elle a même permis une rémission complète de leur maladie. Cependant, il est très difficile d'estimer le bénéfice réel apporté par la transplantation d'hépatocytes dans le traitement de l'insuffisance hépatique aiguë car malgré l'utilisation de cette approche, la mortalité de ces patients reste très élevée (> 40%). La moitié des patients pris en charge ont fait l'objet d'une transplantation d'organe dans les suites c'est-à-dire la quasi totalité des patients survivants. L'indication de la transplantation d'hépatocytes pour l'insuffisance hépatique aiguë reste donc très controversée.

Cependant, des résultats très encourageants ont été rapportés récemment par l'équipe d'Anil

Dhawan au King's College Hospital de Londres en utilisant la technique d'implantation intrapéritonéale d'hépatocytes humains encapsulés dans des microbilles d'alginate [175]. Cette technique de micro-encapsulation d'hépatocytes a été optimisée sur des modèles préclinique ayant permis une persistance de la sécrétion d'albumine et du facteur VII pendant deux semaines quand les microbilles se trouvaient dans une culture contenant du liquide d'ascite des patients atteints d'insuffisance hépatique [175]. Ce type d'approche, avec utilisation de microbilles poreuses contenant des hépatocytes encapsulés, a permis d'implanter des hépatocytes fonctionnels en intrapéritonéal chez un enfant de 8 mois atteint d'une insuffisance hépatique aigue d'origine virale. Un des principaux avantages étant d'isoler du système immunitaire les cellules allogéniques et donc d'éviter la mise en place d'une immunosuppression. Les cellules injectées ont créé un « foie temporaire » qui sécrète les protéines vitales et métabolise toutes les toxines produites. Quelques semaines plus tard, le foie de l'enfant a repris sa fonction complète et l'enfant a guéri sans subir une transplantation hépatique orthotopique [138].

Les résultats de cette première mondiale sont impressionnants. Toutefois, la réalisation d'un large essai clinique est nécessaire pour la validation de cette approche thérapeutique.

➤ Transplantation d'hépatocytes pour déficits métaboliques hépatiques

Les rares protocoles cliniques de transplantation cellulaire réalisés à ce jour pour le traitement de déficits métaboliques hépatiques ont porté sur très peu de patients, en grande majorité des enfants (Tableau 10).

Un des premiers essais cliniques a été réalisé chez une jeune fille de 10 ans atteinte de la maladie de Crigler-Najjar de type I [186]. Ce cas a été un des premiers exemples de l'utilité de la transplantation d'hépatocytes pour le traitement des MMHH. Les hépatocytes ont été isolés à partir d'un donneur âgé de 5 ans dont le foie n'a pas pu être utilisé pour une transplantation

hépatique à cause de l'absence de receveur compatible pour la taille et le groupe sanguin. L'injection via la veine porte de 7.5 milliards d'hépatocytes en trois injections réparties sur 24 heures chez la petite fille a été bien tolérée. La masse d'hépatocytes transplantés a été équivalente à environ 5% de la masse hépatique totale calculée. La fonctionnalité des cellules transplantées a été démontrée par la diminution de moitié de la concentration sanguine de bilirubine 11 mois après, malgré des fluctuations durant les trois premiers mois. L'activité enzymatique de dégradation de la bilirubine, l'UGT1A1 mesurée sur des biopsies hépatiques est passée de 0,4% à 5,5% de l'activité normale. En outre, les séances quotidiennes de photothérapie ont pu être réduites de 12 à 6 heures. Cependant, seul un faible bénéfice clinique a été obtenu et ceci malgré la persistance des cellules transplantées pour plus de trois ans et demi. Pour cette raison, la patiente a subi une transplantation hépatique au bout de quatre ans [214]. Cette étude importante a démontré l'innocuité de la procédure, a permis une amélioration phénotypique nette du déficit métabolique du patient et a confirmé la faisabilité et l'efficacité de la transplantation hépatocytaire pour le traitement de déficits métaboliques congénitaux d'origine hépatique. Cependant, il n'y a pas eu de normalisation de la concentration sanguine de bilirubine. Suite à la réussite partielle de cet essai clinique, d'autres patients atteints du syndrome Crigler-Najjar de type 1 ont été traités par transplantation d'hépatocytes allogéniques, fraîchement isolés ou cryopréservés [175, 227-229].

Les déficits métaboliques liés au cycle de l'urée ont également été traités par transplantation d'hépatocytes avec un succès relatif. En effet un enfant présentant un déficit héréditaire en OTC a bénéficié d'une transplantation fractionnée de 5.3×10^9 hépatocytes au cours des 23 premiers jours post partum [223]. Entre le 20^{ème} et 31^{ème} jour post greffe, une normalisation de l'ammoniémie a été observée avec reprise alimentaire de protéines et suspension du traitement. Le 31^{ème} jour un épisode d'hyperammoniémie a obligé la réintroduction du traitement médical. L'hyperammoniémie a été attribuée à un rejet de greffe, la concentration sanguine de

l'immunosuppresseur étant devenue insuffisante au moment de la rechute.

L'équipe de Strom a rapporté en 1997 la transplantation d'hépatocytes chez 7 malades dont six étaient en insuffisance hépatique aigue, le septième malade présentait un déficit en OTC [226]. Un milliard d'hépatocytes avaient été isolés d'un foie pédiatrique initialement prévu pour greffe orthoptique mais qui n'a pas pu être transplanté à cause de lésions traumatiques du foie droit. Ces hépatocytes ont été perfusés par ponction percutanée de la veine porte à la vitesse de 2 ml/minute. La perfusion s'est passée sans incident. Le taux d'ammoniémie s'est normalisé en 48 heures. L'activité enzymatique OTC, nulle avant la transplantation, a atteint 0,4 $\mu\text{mol/g/minute}$ (correspondant à 0,3-0,5% de l'activité OTC normale). Vingt-huit jours après la transplantation, l'hyperammoniémie s'est majorée avec des concentrations atteignant 378 $\mu\text{mol/L}$. Une nouvelle transplantation de 700×10^6 hépatocytes préalablement congelés a été réalisée. Le patient est resté dans un état de coma malgré la correction de son état métabolique et est décédé d'une bronchopneumonie aigue 42 jours après la première transplantation hépatocytaire. L'autopsie ne montrait pas de thrombose porte, pas d'infection hépatique ni d'autres complications pouvant être en rapport avec la transplantation d'hépatocytes [222].

Par ailleurs le traitement du déficit en A1AT par allotransplantation d'hépatocytes a été tenté chez un enfant de 18 semaines, atteint d'une cirrhose hépatique et chez une adulte exprimant une forme mutée de la protéine, atteinte d'une insuffisance hépatique chronique diagnostiquée [222, 230]. Ces essais cliniques n'ont pas été concluants car les deux patients ont du bénéficier d'une transplantation de foie quelques jours après. Néanmoins, la présence de la forme normale de A1AT a été observée dans la circulation sanguine de la patiente peu après la transplantation cellulaire [230].

Parmi les quelques patients ayant été traités par allotransplantation d'hépatocytes pour des déficits métaboliques hépatiques figurent aussi deux frères atteints d'un déficit congénital en facteur VII de la coagulation [231]. Ils ont chacun reçu via la veine porte une injection de

cellules fraîchement isolées et cryopréservées, équivalente à environ 5% de la masse hépatique totale. Une réduction de 80% des besoins de substitution en facteur VII exogène a été constatée, avant que les deux patients ne subissent une transplantation de foie six mois plus tard à cause de la perte de l'effet thérapeutique.

L'Infantile Refsum Disease (IRD) ou maladie congénitale autosomale récessive du métabolisme du peroxysome a également été l'objet d'une allotransplantation cellulaire. Il y a plus de 10 ans, l'équipe belge de Sokal [189] a réalisé chez une fillette de 4 ans une transplantation. L'IRD est due à un déficit de la bêta-oxydation des chaînes longues d'acides gras, de la biosynthèse du plasmalogène, des acides biliaires et du catabolisme de l'acide pipécolique. Les manifestations cliniques sont digestives et neurologiques. La malade âgée de 4 ans développait une baisse sévère de l'audition et de l'acuité visuelle avec un retard de croissance. Des hépatocytes ont été isolés à partir de foie de 2 donneurs et 1,1 milliard d'hépatocytes frais viables à 50% (équivalent de 5% de la masse hépatique) ont été transplantés le premier jour en deux perfusions successives de 30 minutes. Huit-cents cinquante millions d'hépatocytes congelés dont la viabilité était supérieure à 90% ont été perfusés biquotidiennement du 3ème au 6ème jour post greffe. Une amélioration rapide de l'état métabolique avec une disparition des acides biliaires anormaux a été observée jusqu'à 18 mois sans il n'y a pas eu d'amélioration de l'état neurologique.

Tableau 10 : Quelques exemples de protocoles et résultats des essais cliniques de transplantation d'hépatocytes pour insuffisance hépatique chronique ou aiguë.

Indications	Type d'hépatocytes	Nombre	Voie d'administration	Suivi	Référence
Insuffisances Hépatiques Chroniques					
- Cirrhose (n=10)	Hépatocytes autologues fraîchement isolés	$2 \times 10^7 - 2 \times 10^8$	Intrasplénique	Survie plus longue, supérieure à 10 mois pour seulement un patient	Mito et al [322]
- Cirrhose alcoolique (n=3)	ND	ND	Intraportale	Patients vivants 4 ans après la procédure	Strom et al [323]
- Cirrhose alcoolique (n=2) - Hépatite chronique VHC (n=1)	Hépatocytes cryopréservés allogéniques	ND	Intrasplénique	Décès	Strom et al [287]
Insuffisances Hépatiques Aiguës					
- Hépatite fulminante (n=7)	Hépatocytes humains fœtaux poolés par groupe sanguin	$6 \times 10^7 / \text{kg}$	Intrapéritonéale	Hépatite médicamenteuse ; survie de tous les patients avec une encéphalopathie de grade III (n=2)	Habibullah et al [326]
- Hépatite fulminante (n=3)	Hépatocytes cryopréservés	$4 \times 10^7 - 2.8 \times 10^9$	Intraportale	Hépatite médicamenteuse ; décès	Soriano et al [290]
- Hépatite fulminante (n=11)	Hépatocytes allogéniques cryopréservés	$4 \times 10^8 - 1 \times 10^9$	Intraportale ou intrasplénique	Hépatite médicamenteuse, virale ou postopératoire ; transplantation hépatique (n=6), 1 en rémission et 4 décès	Strom et al [287]
- Hépatite fulminante (n=5)	Hépatocytes cryopréservés pendant 18 mois	$1.3 \times 10^9 - 1 \times 10^{10}$	Intraportale	Hépatite médicamenteuse ou virale ; décès à 12 jours (n=4) et 72 heures (n=1)	Bilir et al [325]
- Hépatite fulminante (n=1)	Hépatocytes allogéniques	8.8×10^8	Intraportale	Hépatite virale ; rémission totale	Fisher et al [327]
- Hépatite fulminante (n=1)	Hépatocytes allogéniques	4.9×10^9	Intraportale	Hépatite alimentaire ; rémission complète et arrêt d'immunosuppression à 12 semaines	Schneider et al [328]

Tableau 11 : Protocoles et résultats des essais cliniques de transplantation d'hépatocytes pour déficits métaboliques du foie.

Indications	Type d'hépatocytes	Nombre	Voie d'administration	Suivi	Référence
Maladies métaboliques					
- Hypercholestérolémie familiale (n=5)	Hépatocytes transfectés <i>in vitro</i> avec le cDNA du récepteur aux LDL humain par vecteurs rétroviraux	$1 \times 10^9 - 3 \times 10^9$	Intrapéritonéale	Réduction > 20% du LDL-cholestérol chez trois patients, expression du transgène <5% > 4 mois	Grossman et al [90, 173]
- Déficit en A1AT (n=2) - Déficit en OTC (n=1)	Hépatocytes cryopréservés	$2.2 \times 10^7 - 1 \times 10^9$	Intraportale	Déficit en OTC : décès par pneumonie 42 jours après Déficit A1AT : transplantation hépatique orthotopique à J4	Strom et al [186,187]
- Déficit en OTC (n=1)	Hépatocytes fraîchement isolés	5.3×10^9	Intraportale	Baisse temporaire de l'hyperammoniémie pour 11 jours, transplantation orthotopique hépatique à la fin	Horslen et al [188,189]
- Syndrome Crigler-Najjar (n=1)	Hépatocytes allogéniques fraîchement isolés	7.5×10^9	Intraportale	3 injections / 24 heures ; diminution de 50% de la bilirubine totale ; transplantation hépatique orthotopique à 4 ans	Fox et al [223, 226]
- Maladie de stockage du glycogène type I (n=1)	Hépatocytes allogéniques	2×10^9	Intraportale	Régime normal 9 mois après transplantation, 7 heures sans épisode d'hypoglycémie	Muraca et al [230]
- Maladie de Refsum (n=1)	Mélange d'hépatocytes fraîchement isolés et cryopréservés	2×10^9	Intraportale	8 injections ; à 18 mois, diminution de 40% de l'acide pipecholique et de 36% du ratio des acides gras c26-c22	Sokal et al [421,473]

Tableau 11. Protocoles et résultats des essais cliniques de transplantation d'hépatocytes pour déficits métaboliques du foie.

Par contre la transplantation d'enfants atteints de cholestase familiale intrahépatique par 0.3×10^9 hépatocytes fraîchement isolés n'a apporté aucun bénéfice thérapeutique [228]. L'échec de l'opération a été attribué à la découverte inattendue d'une fibrose hépatique avancée au moment de la transplantation hépatique orthotopique 5 et 14 mois, respectivement, après les injections cellulaires. Il est probable que dans cette situation un traitement plus précoce aurait pu améliorer le bénéfice thérapeutique.

Plus récemment, Ribes-Koninckx et al. [229] a réalisé un protocole de transplantation intraportale d'hépatocytes allogéniques chez quatre patients atteints de maladies métaboliques du foie (syndrome de Crigler-Najjar, déficit en OTC, tyrosinémie de type I, maladie de stockage du glycogène de type Ia). L'indication pour la transplantation hépatocytaire a été posée devant la gravité de la maladie et le degré de détérioration de la qualité de vie des patients par rapport aux avantages que cette procédure pourrait leur apporter. Tous les patients ont eu une amélioration de leur état clinique, et seul le patient souffrant de tyrosinémie de type I a dû bénéficier d'une transplantation hépatique orthotopique.

En ce qui concerne, l'hypercholestérolémie familiale, Wilson et son équipe en 1991 ont transduit *in vitro* des hépatocytes primaires de lapins Watanabe (modèle de l'hypercholestérolémie familiale) avec un taux de 30% [185]. Ces hépatocytes (2% de la masse hépatocytaire) ont été réinjectés chez l'animal par voie splénique. Le résultat a été une diminution de 30 à 50% en moyenne du cholestérol plasmatique avec une expression hépatique du récepteur aux LDL de l'ordre de 2%, stable pendant plus de 6 mois [185]. Compte tenu des résultats obtenus chez le lapin Watanabe, le premier essai clinique d'autotransplantation d'hépatocytes corrigés *ex vivo* par transfert de gènes a été réalisé aux Etats-Unis par cette même équipe. Ils ont traité 5 patients homozygotes ayant une hypercholestérolémie familiale, âgés de 7 à 41 ans [187, 188]. L'isolement des hépatocytes était fait à partir d'une lobectomie gauche. Les hépatocytes isolés ont été transduits avec des rétrovirus recombinants codant pour le gène

du R-LDL selon le protocole mis au point chez le lapin. Le taux moyen de transduction était de 20%. Ainsi 1 à 3 milliards de cellules génétiquement modifiées ont été autotransplantées par voie portale. Pendant la transplantation des hépatocytes, une élévation transitoire de la pression portale a été notée, mais il n'y a pas eu de thrombose portale. Des réductions significatives des concentrations en cholestérol total, LDL, et apolipoprotéine B ont été obtenues chez 3 malades sur 5. L'impact clinique du traitement, évalué en comparant les concentrations sériques du cholestérol et des LDL après réintroduction des traitements par voie orale, a été significatif chez un seul malade. Seul le premier malade publié avait un recul de 18 mois. La présence d'hépatocytes exprimant le transgène dans son foie, mis en évidence par une méthode d'hybridation *in situ* a été confirmée 4 mois après le traitement et évaluée à 1 cellule sur 10 000. Les autres malades n'avaient qu'un recul de 4 mois quand l'étude a été arrêtée. Ces résultats n'ont donc pas mis clairement en évidence une corrélation entre la diminution des LDL plasmatiques et une augmentation de l'activité des récepteurs aux LDL. Des problèmes liés au faible taux de transduction d'hépatocytes primaires et probablement au choix des séquences régulatrices gouvernant l'expression du transgène persiste. Ce travail a cependant démontré la faisabilité et la bonne tolérance de l'approche de thérapie génique *ex vivo* pour le traitement de l'hypercholestérolémie familiale chez l'homme.

1.7. Comment améliorer la prise de greffe

1.7.1. Qualité des cellules greffées

L'efficacité d'une transplantation cellulaire repose sur la qualité des cellules transplantées. Il est donc impératif d'évaluer la qualité des cellules avant leur transplantation. Cette évaluation doit se faire à plusieurs niveaux :

-Test de vitalité et fonctionnalité: dans la plupart des études publiées, un test au bleu trypan est le seul critère utilisé du fait de sa simplicité et sa rapidité de réalisation. Ce dernier ne peut

malheureusement pas évaluer la fonctionnalité ni prédire la capacité d'implantation des cellules greffées. Le test de détermination des taux intracellulaires d'ATP pourrait informer sur la qualité métabolique des cellules. Pour une évaluation métabolique encore plus poussée, on peut avoir recours à des techniques biochimiques élaborées comme la spectrométrie de masse ou la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN). Ces techniques peuvent évaluer la capacité de synthèse de l'urée et l'activité des cytochromes P450 [232]. Le matériel nécessaire pour réaliser ces essais n'est pas disponible dans tous les laboratoires. D'autres tests métaboliques sensibles, rapides (en 2 heures) et peu consommateurs de cellules (40 000) existent [180]. Ils sont basés sur la fluorescence détectée par un spectrophotomètre à fluorescence, luminescence détectée par un luminomètre ou bien par la formation d'un métabolite coloré visible à l'œil nu [180].

-Conservation pré-greffe : L'amélioration du processus de congélation des cellules est une des solutions pour éviter la destruction des mitochondries, la perte de la capacité de synthèse de l'ATP ou l'apparition d'une activité anormale de la chaîne enzymatique respiratoire [176, 233].

-Evaluation des capacités adhérentielles : la prise de greffe des hépatocytes serait corrélée avec leur capacité d'adhérence *in vitro* sur un support approprié ainsi qu'à une meilleure viabilité [91]. Ainsi les meilleures cellules adhèreraient plus rapidement après mise en culture. Ces évaluations *in vitro* doivent être corrélées aux études *in vivo* afin de pouvoir prédire une bonne/mauvaise efficacité de transplantation des cellules à transplanter. Les résultats obtenus dans les modèles animaux ne sont toujours pas extrapolables à l'homme mais permettent au moins de s'assurer de la qualité du matériel utilisé.

1.7.2. Type de cellules disponibles pour la transplantation

1.7.2.1. Hépatocytes adultes

Le premier protocole de perfusion hépatique pour permettre de récupérer de façon spécifique des hépatocytes a été établi en 1953 par une équipe New-yorkaise [234]. Ce dernier consistait à

perfuser le foie de rat sous pression à l'aide d'une solution de chélateurs d'ions métalliques dépourvue de Ca^{2+} . Malheureusement cette méthode altère les cellules isolées et entraîne la perte de leurs enzymes cytoplasmiques [235]. La première récupération d'hépatocytes isolés intacts a été possible par l'utilisation de préparation de foie à base de collagénases en 1967. L'introduction de ce type de préparation du foie a permis les études expérimentales et l'utilisation des hépatocytes en culture, permettant ainsi les analyses sur le métabolisme et la toxicologie [235]. En pratique, l'isolation/perfusion d'hépatocytes est une procédure réalisée en routine avec un excellent rendement et des cellules de qualité [226]. Pour la détailler, on effectue une digestion en deux temps par une perfusion de collagénase puis par un chélateur de calcium à 37°C, les hépatocytes se dissocient et seront séparés des autres populations cellulaires par une centrifugation à faible vitesse. Pour éviter la perte de fonctions, les hépatocytes ainsi isolés doivent être utilisés dans les 24 heures ou congelés dans un milieu de cryopréservation approprié [236]. Cette procédure a été utilisée dans de nombreux modèles animaux dont les souris transgéniques et le rat avec de très bons résultats fonctionnels pour les hépatocytes intégrés dans le parenchyme hépatique [191]. Ces données ont été confirmées dans notre laboratoire chez un modèle de primate non-humain [172]. D'autres transplantations autologues par voie intra-portale d'hépatocytes transduits par des rétrovirus exprimant la β -galactosidase ont été réalisées. La quantification des cellules exprimant cette enzyme à partir de biopsies du foie receveur montre qu'au mieux, seule la moitié des cellules transplantées intègrent le parenchyme hépatique 4 jours après leur transplantation ce qui correspond à 2% de la masse totale [237].

Les hépatocytes adultes transplantés ne prolifèrent *in situ* dans le foie receveur que s'ils disposent d'un signal de prolifération. Ils doivent par ailleurs, pour remplacer les hépatocytes résidents, avoir un avantage prolifératif [238]. Ainsi, des modèles de transplantation ont été réalisées chez des souris immunodéficientes homozygotes albumine/urokinase plasminogène A

(uPA), souris transgéniques développées en introduisant le gène de l'enzyme uPA sous contrôle du promoteur de l'albumine. Ce modèle est caractérisé par un saignement incontrôlé, des signes d'inflammations du foie, une nécrose et un petit nombre d'hépatocytes matures [239]. Les hépatocytes de l'hôte expriment l'uPA (un transgène toxique), ce qui les rends très fragiles et correspond à un avantage prolifératif pour les cellules transplantées (qui n'expriment pas le transgène toxique). La transplantation des hépatocytes de rat dans ce modèle permet un repeuplement total du foie receveur [240]. Un autre modèle murin de tyrosinémie de type 1 correspond à des souris déficientes pour l'enzyme hépatique FAH (Fumaryl Acetoacetate Hydrolase) responsable d'une accumulation de métabolites toxiques dans les hépatocytes. Des hépatocytes murins FAH^{-/-} corrigés génétiquement *in vitro* à l'aide de rétrovirus ont été transplantés dans ce modèle. Une correction du déficit ainsi qu'un repeuplement significatif du foie receveur FAH^{-/-} ont été démontrés [241]. Un autre modèle murin permet l'étude de l'infection avec le virus de l'hépatite B (VHB) avec des souris immunodéficientes uPA/RAG2 γ c^{-/-}. Ces souris ont été transplantées avec des hépatocytes primaires de Tupaia puis infectés par le VHB. Les hépatocytes xénogéniques sont parvenus à repeupler le foie receveur [242]. Le modèle de rat déficient en l'enzyme DPPIV (Dipeptidyl peptidase IV) a été largement utilisé pour étudier la biologie des cellules transplantées. La DPPIV est exprimée au pôle apical de la membrane hépatocytaire au niveau des canalicules biliaires, ce qui fournit un système adéquat pour la visualisation des canalicules hybrides entre les hépatocytes résidents et les hépatocytes transplantés et l'évaluation de l'efficacité de la prise de greffe [242]. Un repeuplement efficace a été reporté chez ces rats en combinant un traitement à la rétroisine, un alcaloïde qui provoque l'arrêt de prolifération des hépatocytes en phase G2 et G2M tout en maintenant leur potentiel métabolique, et une hépatectomie de 70% [195]. L'efficacité de la transplantation des hépatocytes nécessite une préparation du foie receveur car sans stimulus régénératif le taux de prise de greffe reste faible (moins de 1%) [180].

Les hépatocytes récupérés par perfusion d'organe restent fragile avec une faible résistance aux conditions de culture (absence de prolifération et dédifférenciation) et à la congélation/décongélation. Par ailleurs, la pénurie d'organes et/ou les difficultés techniques avec morbidité propre liées à l'autoprélèvement de lobe hépatique limitent fortement le développement clinique de thérapie cellulaire à base d'hépatocytes.

Ces contraintes cliniques liées à l'utilisation d'hépatocytes ont encouragé l'investigation et le développement de sources cellulaires alternatives.

1.7.2.2. Les hépatoblastes

Les problématiques de fragilité en culture et de faible prolifération des hépatocytes ont abouti à l'évaluation du potentiel des cellules progénitrices de foie fœtal ou d'hépatoblastes à la place des hépatocytes adultes.

L'utilisation des hépatoblastes semble plus avantageuse par rapport aux hépatocytes adultes car les hépatoblastes sont plus petits que les hépatocytes adultes (15-30µm) ce qui peut faciliter leur passage à travers la couche des cellules endothéliales pour intégrer le parenchyme hépatique et diminuer les risques d'embolie portale. Ils peuvent également proliférer *in vitro* et *in vivo*. Enfin, les hépatoblastes ont montré des capacités d'implantation dans le foie receveur supérieures à celles des hépatocytes adultes chez les rongeurs en système syngénique (le donneur et le receveur sont génétiquement identiques).

Chez la souris, des hépatoblastes ont pu être purifiés par cytométrie de flux et des clones, présentant un potentiel de différenciation vers le foie, le pancréas, l'estomac et d'auto-renouvellement ont ainsi été identifiés [243]. Après transplantation chez des souris Balb/cA, ces cellules ont pu se différencier en hépatocytes, canaux biliaires, cellules ductales pancréatiques et en épithélium intestinal. Néanmoins, ces cellules souches sont rares et leur nombre diminue avec l'âge [243]. Chez l'homme, des cellules souches hépatiques similaires ont été isolées par cytométrie de flux, à partir de fœtus âgés de 18 à 22 semaines de grossesse [243]. Cependant,

ces cellules n'étaient pas capables de repeupler les foies des souris immunotolérantes Rag2^{-/-} Rγ^{-/-} traitées à la rétrovirus (afin d'inhiber la réplication des hépatocytes natifs) au préalable. Dans notre laboratoire, un protocole a été mis au point pour isoler des hépatoblastes du foie fœtal humain âgé entre 11 et 13 semaines de grossesse [244]. En culture, la population cellulaire isolée se constitue d'environ 80% d'hépatoblastes bipotents, de cellules souches mésenchymateuses, d'hépatocytes et de cholangiocytes fœtaux. Après transplantation de cellules congelées et/ou décongelées chez des souris athymiques, le pourcentage de prise de greffe est estimé entre 1 à 10 % dans le foie receveur [244]. Ces cellules humaines transplantées exprimaient des marqueurs d'hépatocytes adultes comme l'albumine [245]. Par ailleurs, l'équipe de Gupta a marqué des hépatoblastes adultes et fœtaux à l'¹¹¹Indium et a montré que ces 2 types cellulaires ont une biodistribution similaire dans le foie sans translocation dans la circulation systémique ou pulmonaire [246]. Ces résultats n'ont pas pu être reproduits chez les souris uPA dans laquelle les cellules hépatiques fœtales humaines (14 à 17 semaines de grossesse) transplantées ont montré un faible repeuplement hépatique comparée aux hépatocytes adultes [247].

1.7.2.3. Les cellules ovales

C'est en 1957 que Wilson et Leduc décrivent pour la première fois les cellules ovales chez le rongeur [248]. Ces cellules expriment à la fois des marqueurs cholangiocytaires comme les cytokératines 7 (CK7) et 19 (CK19), ainsi que des marqueurs hépatocytaires comme l' α -foetoprotéine (AFP) et l'albumine [249, 250]. Ces cellules sont capables de proliférer et de peupler l'espace périportal. Suite à une lésion hépatique, par une drogue par exemple, les cellules ovales s'activent et se différencient en hépatocytes [249, 250]. Des cellules ovales isolées à partir d'un foie traité par du DDC (3,5-diethoxycarbonyl-1-4dihydrocollidine), un inducteur de cirrhose alcoolique, montrent des capacités métaboliques et de repeuplement de ces cellules après transplantation dans des souris déficientes pour la FAH (fumarylacetoacetate

hydrolase) [251]. D'autre part, des cellules ovales isolées à partir de souris transgéniques surexprimant la GFP (green fluorescent protein) et transduites avec une construction virale exprimant l' α -1-antitrypsine ont été transplantées dans des souris chez qui le foie est préparé par une HP et traité à la monocrotaline. Dans les foies de ces souris il y a eu 40 à 50% de repeuplement par des cellules exprimant la GFP parmi lesquelles 5 à 10% de cellules expriment l' α -1 antitrypsine humaine [252].

Malheureusement, ces cellules ovales du rongeur n'ont pas d'équivalent chez l'homme. En 2007, Schmelzer a isolé des cellules souches hépatiques humaines à partir de foies fœtaux et adultes [62]. Sur coupes, ces cellules sont immunoréactives pour le marqueur épithélial EpCAM (Epithelial specific cell adhesion molecule) qui est exprimé au niveau de la plaque ductale et autour de l'espace porte dans le foie fœtal tandis que dans le foie adulte, son expression est plutôt limitée dans l'espace porte au niveau du canal de Hering. Mais l'injection de ces cellules en sous-cutané chez des souris nude induit une tumeur mésoenchymateuse [253]. Chez l'homme, les cellules ovales sont génétiquement instables et sont capables d'engendrer des cancers hépatocytaires ou cholangiocytaires [254].

Il est donc nécessaire de trouver d'autres types cellulaires faciles à isoler et à amplifier *in vitro* avec la capacité de se différencier en hépatocytes fonctionnels sans risque pour le patient.

1.7.2.4. Les cellules souches hépatiques de l'arbre biliaire

Les cellules souches humaines de l'arbre biliaire (hBTSCs) ont été isolé à partir du fœtus et de l'adulte en grande quantité dans les conduits biliaires intrahépatiques et extra-hépatiques, plus précisément, elles résident dans l'épithélium des glandes péri-biliaires (PBG) et des cryptes de la vésicule biliaire [255]. Ces hBTSCs sont capables de se reproduire en culture et de se différencier en hépatocytes matures, cholangiocytes, ou en cellules β pancréatiques *in vitro* et *in vivo* [255, 256]. Quelques essais cliniques ont été réalisés pour évaluer ces cellules souches

notamment à partir de foie fœtale transplantées dans l'artère hépatique de patients atteints de cirrhoses comme dans l'étude de Cardinale et al. Ou l'immunosuppression n'a pas été nécessaire à plus d'un an chez les deux patients cirrhotiques traités [257]. D'autres études ont mis en évidence que chez des patients transplantés avec 100-150 millions de hBTSCs, la fonction hépatique et la survie étaient améliorée à plus d'un an de suivie [258]. Mais des évaluations complètes de la sécurité et de l'efficacité des transplantations sont encore nécessaires. Par ailleurs leur utilisation pour le diabète reste à explorer, avec des études précliniques en cours [258].

1.7.2.5. Les cellules souches embryonnaires humaines (hESC)

Les hESC sont isolées *in vitro* à partir du blastocyste d'embryons âgés d'environ 5 jours initialement destinés à la fécondation *in vitro* [259-261]. En culture, ces cellules forment des colonies avec un rapport nucléo/cytoplasmique élevé. Ces hESC ont été isolées par Thomson en 1998 [261] (Figure 21).

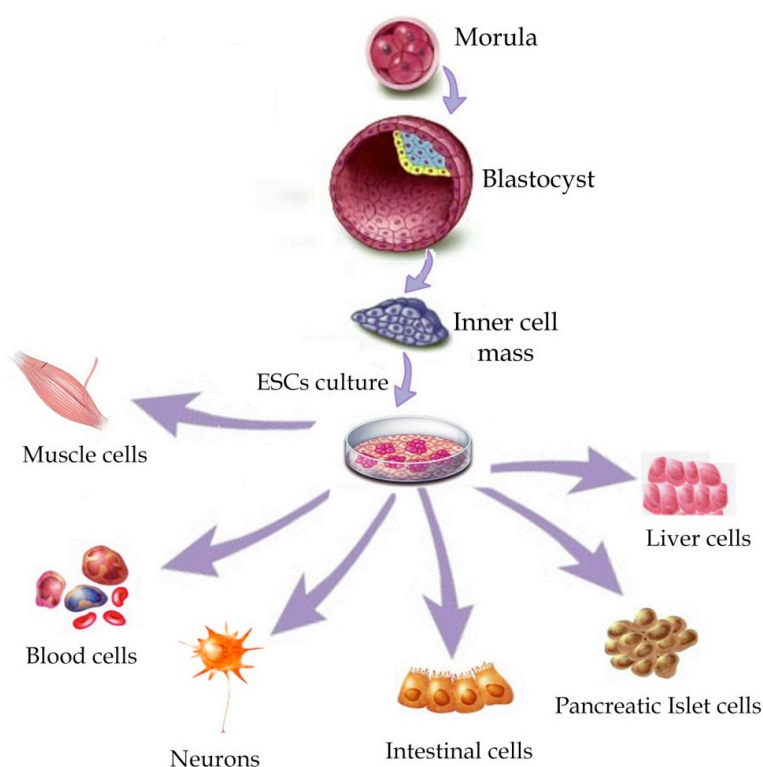


Figure 21: Origine et potentiel de différenciation des cellules souches embryonnaires humaines. Les hESC humaines sont isolées à partir de la masse interne du blastocyste âgé de 4 à 5 jours de développement embryonnaire. Les cellules de la masse interne sont mises en culture sur une couche de cellules nourricières. Les hESC, pluripotentes, sont dotées d'un potentiel d'auto-renouvellement [262]

Il existe des lignées de hESC de type femelle et mâle. Les premières lignées ont été dérivées à partir d'embryons de caryotype XX (H9, H7) ou XY (H1, H13, H14) normaux. Ces cellules ont une forte activité télomérase et de ce fait elles sont capables de proliférer indéfiniment [263]. Ces hESC expriment les marqueurs de surface caractéristiques du stade embryonnaire comme le SSEA-3 (Stage Specific Embryonic Antigen), SSEA-4, TRA1-60 (Tumor Rejection Antigen 1), TRA1-81 et des facteurs de transcription impliqués dans le maintien de la pluripotence comme OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4), NANOG et SOX2. Pour évaluer leur pluripotence *in vivo*, des hESC sont transplantées dans les testicules de souris immunodéprimées. Les cellules forment ainsi des tératocarcinomes comprenant des cellules dérivées des 3 feuillets embryonnaires [261]. La pluripotence des hESC peut être évaluée *in vitro* par leur capacité à former des corps embryoïdes en culture (suspension) en présence de sérum et en absence de FGF2. Après 2 à 3 semaines de culture en suspension, ces corps embryoïdes vont se différencier spontanément en différents types cellulaires issus de 3 feuillets embryonnaires. Plusieurs mécanismes moléculaires sont à la base du maintien de cette pluripotence notamment l'activation des voies Activine A/ Nodal/ TGF- β [264, 265].

Plusieurs équipes ont essayé de différencier les hESC en hépatocytes selon différents protocoles généralement constitués de 3 étapes. La première consiste à différencier les hESC en endoderme définitif puis à les orienter vers la voie hépatocytaire généralement en présence de BMP4 (Bone morphogen protein 4) et FGF puis à maturer les hépatoblastes (progéniteurs hépatiques bipotents) en hépatocytes sous l'influence d'OSM (oncostatine M) et de HGF

(Hepatocyte Growth Factor) [266-272]. Notre équipe a mis au point des conditions de différenciation en endoderme définitif des hESC en cultivant les cellules en présence du Ly294002 (inhibiteur de la voie PI3-Kinase), Activine A, BMP4 et du FGF2 pendant 3 jours. Les cellules endodermiques ainsi obtenues étaient différenciées en hépatocytes. Les progéniteurs hépatiques ainsi obtenus étaient maturés en hépatocytes en présence de FGF4, de HGF et d'EGF pendant 10 jours [273]. A la fin de la différenciation, les cellules obtenues expriment des marqueurs hépatocytaires comme l'AFP et HNF4 α et acquièrent une fonctionnalité hépatique *in vitro* comme le stockage du glycogène, l'internalisation du Dil-LDL et de l'indocyanine green [273]. Une autre approche consiste à générer des hépatoblastes à partir de l'endoderme définitif issu des hESC. Cette approche consiste à surexprimer HHX par transduction adénovirale des cellules endodermiques. A la fin de cette différenciation, les cellules obtenues expriment des marqueurs hépatocytaires matures comme l'albumine, CK18, CYP3A4 et présentent une activité CYP3A4. Cependant, l'expression de ces marqueurs reste à un niveau inférieur à celui détecté dans le foie fœtal [274].

Des cellules AFP positives dérivées des hESC ont été transplantées en intra-splénique chez des souris. Sept jours après la transplantation, une implantation des cellules humaines a été observée autour de la veine porte [275]. Cependant, 60 à 90 jours plus tard des tératomes ont été observés dans la rate des souris. Une autre équipe a transplanté des cellules différenciées en intra-splénique à des souris NOD/SCID ayant subi une hépatectomie partielle de 50% [272]. La présence d'A1AT et d'albumine humaine a été détectée 3 semaines après la transplantation. Cependant, des tératomes se sont développés dans le foie, la rate et la cavité péritonéale prouvant l'hétérogénéité de la population cellulaire injectée [272]. Pour pallier ce problème, les auteurs ont trié leurs cellules par cytométrie de flux. Quinze jours après la transplantation de cette population hépatocytaire dans des souris Alb-uPA SCID ou dans des rats immunodéficients, l'albumine et l'AAT humaines ont été détectés dans le sérum de l'animal.

Aucune tumeur ne s'est formée dans le foie de ces animaux. Par contre, des adénocarcinomes ont été constatés dans la cavité péritonéale [272]. Dans notre équipe, des hESC transduites par un lentivirus codant la GFP puis différenciées en hépatocytes ont été transplantées en intra-hépatique dans des souris nouveau-nées Alb-uPA rag2 γ c^{-/-}. Huit semaines après transplantation, des cellules humaines exprimant les marqueurs hépatiques albumine et l' α -1 antitrypsine ont été mises en évidence dans le foie de certaines souris mais seule une faible quantité d'albumine humaine a été détectée dans le sérum des souris [273]. Aucune tumeur n'a été détectée chez ces animaux.

1.7.2.6. Cellules souches pluripotentes induites humaines (hiPSC)

Les hiPSC sont présentées comme l'une des alternatives à l'utilisation des hESC en thérapie cellulaire. Ces cellules, issues de la reprogrammation des cellules somatiques adultes notamment les fibroblastes, permettraient d'éviter les problèmes éthiques liés à l'utilisation des hESC issues d'embryons humains. Par ailleurs ces cellules pourraient éviter les problèmes de rejet car la reprogrammation se fait avec des cellules du receveur. L'espoir qui est né avec ces cellules a même valu un prix Nobel de médecine en 2012 à leur père.

- En 2006, l'équipe de Yamanaka a réussi, à l'aide de vecteurs rétroviraux, à générer des cellules pluripotentes ayant des caractéristiques comparables aux hESC avec l'expression ectopique et transitoire de 2 facteurs de transcription (OCT4, SOX2) par reprogrammation de cellules somatiques comme des fibroblastes adultes (Figure 23a) [276]. En 2007 l'équipe de Thomson a généré également des hiPSC en utilisant une autre combinaison de facteurs de transcription (OCT 4, SOX2, NANOG, LIN 28) [277]. Plusieurs paramètres de reprogrammation peuvent être modifiés comme le nombre de facteurs de transcription utilisés, les différents types de vecteurs (Figure 23b) et le type cellulaire utilisé. L'efficacité et la durée de la reprogrammation dépendent de ces

parameters [276, 278-280].

Les hiPSC générées par les différentes approches sont pluripotentes et similaires aux hESC (phénotype, caractéristiques fonctionnelles et capacité à se différencier vers tous les lignages des 3 feuillets embryonnaires). Leur pluripotence peut être vérifiée par plusieurs moyens (tableau 12).

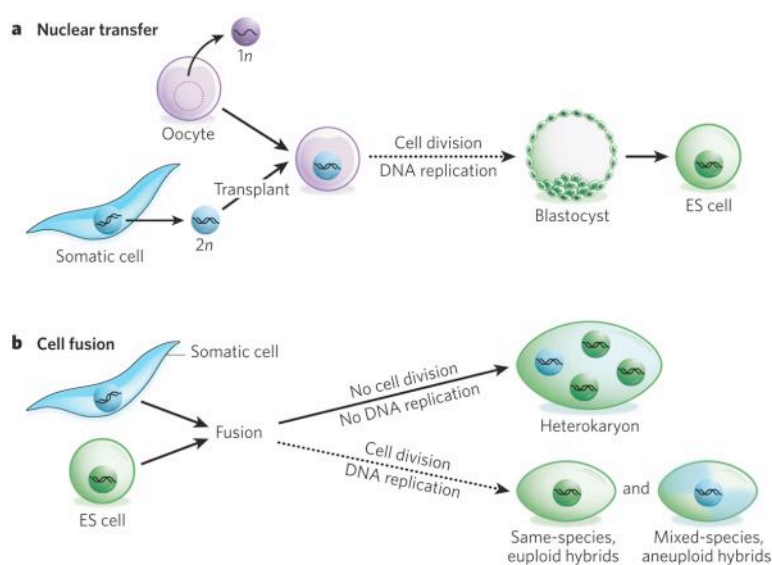


Figure 22: Reprogrammation cellulaire *in vitro*. (a) Le transfert nucléaire : transfert du noyau d'une cellule somatique dans un ovocyte énucléé. Le noyau va être ainsi reprogrammé et un blastocyste va être généré à partir duquel des hESC peuvent être isolées. (b) La fusion cellulaire : fusion entre un noyau d'une cellule somatique et une hESC générant ainsi un hétérocaryon incapable de se diviser ou bien un hybride, adapté de Yamanaka, Nature, 2010 [281].

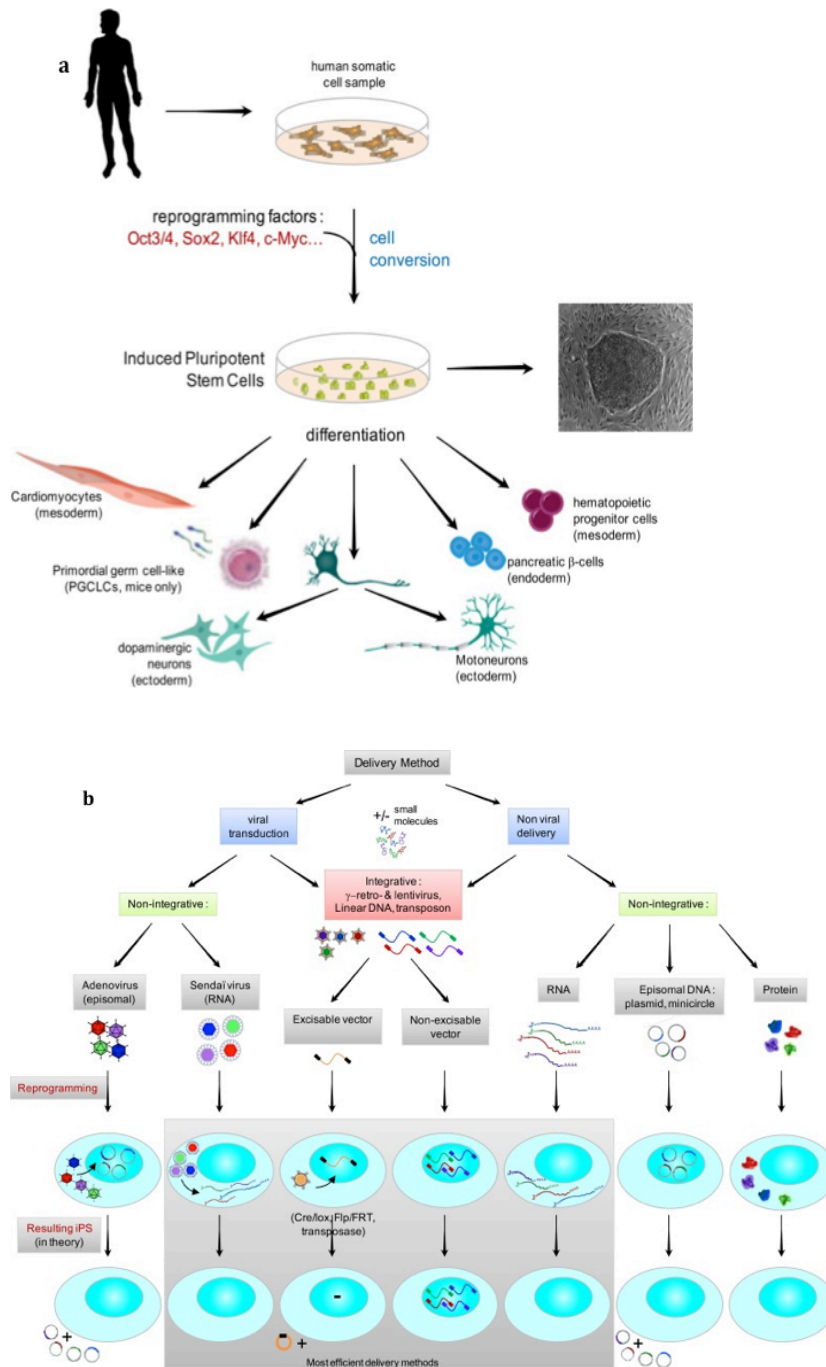


Figure 23: La technologie des hiPSC. (a) Représentation schématique de la reprogrammation d'une cellule somatique en cellule hiPSC capable de se différencier vers les 3 lignages embryonnaires. (b) Représentation des différents types de vecteurs qui pourraient être utilisés pour la reprogrammation des cellules somatiques en hiPSC. Il existe des vecteurs viraux, non viraux, intégratifs, non intégratifs et sans transgène [282].

Tableau 12 : Méthodes et marqueurs utilisés pour caractériser et évaluer la reprogrammation en cellules hiPSC [282].

Méthodes de détection	Marqueurs
Immunomarquage	Phosphatase alcaline OCT4, NANOG, SOX2, KLF4 Tra-1-60, Tra-1-81, c-MYC SSEA1, SSEA3, SSEA4
Cytométrie de flux	OCT4, NANOG, SOX2, KLF4 Tra-1-60, Tra-1-81, c-MYC SSEA3, SSEA4
Western blot	OCT4, SOX2, KLF4, c-MYC
qRT-PCR	expression endogène de OCT4, SOX2, KLF4, NANOG, LIN28 hTERT, REX1, SALL4, DPPA2, DPPA4 GDF3, C-MYC, PPIA, DNMT3B doit être réactivé Les transgènes de reprogrammation exogènes doivent être inactivés
Séquençage au bisulfite	Les promoteurs endogènes de OCT4 et NANOG doivent être activés Les promoteurs contrôlant l'expression des transgènes de reprogrammation exogènes doivent être inactivés
Formation de tératomes dans des souris immunodéficientes	différenciation en différents types cellulaires issus des 3 feuillets embryonnaires
Formation de corps embryoides	

Abréviations : octamer-binding transcription factor 4 (OCT4), sex determining region Y box 2 (SOX2), kruppel-like factor 4 (KLF4), stage specific antigen (SSEA), telomerase reverse transcriptase (hTERT), developmental pluripotency-associated protein (DPPA), growth differentiation factor-3(GDF3), peptidylprolyl isomerase A (PPIA), DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 beta (DNMT3B).

La différenciation hépatocytaire des hiPSC se fait généralement en utilisant les mêmes protocoles de différenciation appliqués sur des hESC (voir précédemment). La majorité des protocoles consiste à différencier les hiPSC dans un premier temps en endoderme définitif ou en corps embryoides et par la suite, vers la voie hépatique [271, 273, 283, 284]. Indépendamment de la race, du sexe et de l'origine tissulaire ou ontologique, les hiPSC générées ont montré le même potentiel de différenciation en hépatocytes [283, 285]. La bonne différenciation hépatocytaire des hiPSC est généralement évaluée par leur aspect morphologique, l'expression de l'albumine et par la présence d'une activité des cytochromes CYP1A2 et CYP3A4 [285, 286]. Comme le laissait prévoir la similitude du potentiel de

différenciation hépatocytaire entre les hESC et les hiPSC, il a été montré que les hiPSC de souris sont capables de s'implanter dans le foie de souris receveur après transplantation [287]. Par contre, elles n'étaient pas capables de participer à une régénération hépatique [287]. Chen et al ont transplanté au niveau intra-splénique dans un modèle de souris NOD/SCID (non-obèse diabétique/déficit immunitaire combiné sévère) ayant subi un traitement au CCL4 (pour induire une insuffisance hépatique fulminante létale), des cellules *hepatocyte-like* issues de la différenciation en 3 étapes de hiPSC. Les souris transplantées ont survécu avec prise de greffe mais pas de fonctionnalité ni de véritable repeuplement comme c'est le cas dans la plupart des séries sur les hiPSC [288, 289]. Ainsi, les hiPSC qui promettaient de révolutionner la recherche et le traitement des maladies du foie, ne seraient pas véritablement fonctionnelles *in vivo*. Enfin, malgré les progrès réalisés dans la promotion de la différenciation des hiPSC, une prolifération abondante *in vivo* n'a jamais été possible [271, 287, 290]. La raison qui permettrait d'expliquer ces échecs de fonctionnalité *in vivo* résiderait dans la nécessité d'une expansion importante post-transplantation des hépatocytes pour établir et maintenir une masse de cellules transplantées thérapeutiques efficaces chez les patients [180]. Une étude récente semble résoudre le problème et a permis le repeuplement d'un foie de souris par des hépatocytes dérivés de fibroblastes humains [291]. Contrairement aux protocoles usuels de production d'hiPSC à partir de fibroblastes humains, cette équipe a réalisé une reprogrammation directe en sélectionnant les cellules à marqueurs endodermiques dans les progéniteurs pluripotents. Ces cellules endodermiques sont alors différenciées de façon classique en hépatocytes sans altérer les capacités de prolifération [291]. Un modèle de souris uPA (souris immunodéficiente et transgénique hétérozygote pour l'activateur de urokinase-type plasminogène sous le contrôle du promoteur de l'albumine) sont transplantées par les cellules hépatocytaires qui ont largement proliféré et corrigé le trouble métabolique. Par ailleurs dans cette étude il n'y a pas eu formation de tératome avec ces cellules, probablement parce que les cellules ne sont jamais entrées dans

un état de pluripotence. À notre connaissance, cette étude est la première démonstration de repeuplement significatif du foie de souris avec des hépatocytes humains générés *in vitro*, ce qui supprime un des obstacles sur la voie de traitement des cellules hépatiques autologues.

Quoiqu'il en soit, l'utilisation des cellules *hepatocyte-like* dérivées d'iPSC dans la thérapie cellulaire, présente encore des dangers de sécurité et d'efficacité. A ce jour, il n'y a pas encore eu d'essais cliniques avec les cellules *hepatocyte-like* dérivées de hiPSC, pour le traitement des maladies du foie humain car ce type de reprogrammation présente un risque important d'anomalies génétiques.

1.7.2.7. Cellules souches somatiques

➤ Cellules souches hématopoïétiques

Les cellules souches hématopoïétiques sont les cellules souches les plus étudiées dans la littérature. Elles sont situées de façon prédominante dans la moelle osseuse et des études ont montré que ces cellules pourraient contribuer à la reconstitution de plusieurs tissus non hématopoïétiques [292]. Par ailleurs les cellules souches hématopoïétiques et les cellules souches hépatiques étant donné que ces deux lignages expriment des marqueurs communs comme le CD34 (Cluster of Differentiation), CD117 (c-Kit) et le CD90 (Thy-1) [293]. En 2000, Theise et al ont montré que suite à une allogreffe de moelle osseuse, des cellules du donneur pourraient être détectées dans le foie du receveur ce qui peut être la résultante d'une transdifférenciation *in vivo* des cellules médullaires en hépatocytes [294]. Dans des conditions expérimentales définies chez l'animal, les cellules souches hématopoïétiques peuvent se différencier en cellules ovales ou en hépatocytes pour repeupler ainsi le foie de l'animal receveur [295]. Lagasse et al suggèrent que seule la population de cellules souches hématopoïétiques CD117⁺ Sca-1⁺CD90^{low}lin⁻ a la capacité de générer des hépatocytes *in vivo* [296, 297]. Cependant, des études menées chez les rongeurs démontrent que les hépatocytes

dérivés de la moelle osseuse sont le résultat d'une fusion entre une cellule myélomonocytaire issue de la moelle osseuse du donneur et un hépatocyte du receveur [251, 298]. Cette fusion induit une reprogrammation génétique des cellules hématopoïétiques du donneur pour adopter un profil d'expression plus hépato-spécifique. Des phénomènes de trans-différenciation ont aussi été observés, c'est-à-dire l'obtention d'hépatocytes sans fusion cellulaire, chez la souris *in vitro* en cultivant des cellules souches hématopoïétiques avec du surnageant de foies lésés [299]. De même, après l'injection de cellules mononuclées du sang de cordon humain dans des souris NOD/SCID, des hépatocytes générés à partir de ces cellules peuvent être détectés sans phénomène de fusion cellulaire [300]. Une autre équipe a également démontré que les cellules souches hématopoïétiques humaines sont capables de participer à l'hépatogenèse dans le foie fœtal de mouton sans fusion cellulaire [301]. Ainsi cette source cellulaire est potentiellement effective mais l'obtention d'hépatocytes passerait par une transdifférenciation difficilement contrôlable ou de très rares cas de différenciation *in vivo* ne permettant pas son utilisation en clinique.

➤ Cellules souches mésenchymateuses (CSM)

C'est en 1976 que l'équipe de Friedenstein a mis en évidence, à partir de moelle osseuse, des cellules de forme fibroblastique, adhérentes au plastique en culture et ayant une capacité ostéogénique [302]. D'autres études ont démontré par la suite la multipotence de ces cellules ostéogéniques c'est-à-dire leur capacité à se différencier en adipoblastes, ostéoblastes, chondroblastes et en myoblastes [203, 303-305]. Sur un modèle de chambre de Boyden implantée dans le péritoine de rats, ces cellules en culture maintiennent leur capacité de différenciation même après 30 doublements de population. La démonstration de ce potentiel clonal est réalisé par Pittenger et *al*, prouvant la multipotence intrinsèque de ces cellules, validant le concept de cellules souches mésenchymateuses (CSM) [306]. De ce fait, une CSM est une cellule de morphologie fibroblastique, adhérente en culture et capable de se différencier

in vitro au moins en adipoblastes, ostéoblastes et chondroblastes [307, 308].

Il n'existe pas de marqueur unique spécifique pour cette population cellulaire. Par contre, les MSC de toutes les origines tissulaires présentent un profil commun d'expression caractéristique. Ce profil est défini par l'absence de marqueurs de différenciation du lignage hématopoïétique (CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 α ou CD19 et HLA-DR) et par l'expression du CD73, CD90, CD105 [307, 308]. Une sélection avec le marqueur CD133 des MSC du sang de cordon ombilical ou périphérique permet d'isoler une fraction cellulaire plus proliférative [309].

Les CSM, comme toutes les cellules souches, sont dotées d'un potentiel d'auto-renouvellement c'est-à-dire qu'elles sont capables de générer des cellules identiques à elles-mêmes par division mitotique sur une longue période. En pratique, les CSM sont capables de former des colonies de type fibroblastique et la densité d'ensemencement de ces cellules joue un rôle dans leur capacité d'expansion et les CSM peuvent être cultivées à basse densité (1 à 3 cellules/cm²) [310]. Des CSM ont été identifiées dans presque tous les organes du corps (Tableau 13). L'hétérogénéité des CSM (de différentes origines tissulaires ou bien du même organe) est surtout représentée au niveau de leur potentiel de différenciation et de leurs propriétés biologiques comme la prolifération [310]. Ainsi, Muraglia et *al.* ont montré qu'après la mise en culture, seul un tiers des cellules adhérentes sont multipotentes, les autres sont juste bipotentes ou bien unipotentes [311]. Des CSM ont été isolées dans le foie fœtal humain à partir de 12 semaines de grossesse et ont été comparées à celles de la moelle osseuse et de la rate [312]. Cette étude réalisée à l'échelle clonale montre que les CSM d'origine fœtale sont phénotypiquement très similaires entre elles malgré la présence d'une hétérogénéité dans leurs potentiels de différenciation [312]. Par contre les CSM fœtales ont une plus grande capacité de prolifération ce qui leur donne une préférence pour une éventuelle application en thérapie cellulaire [313].

Deux populations de cellules mésenchymateuses ont été isolées à partir du foie adulte, les

HLSC (Human Liver Stem Cells) et les ADHLSC (Adult-Derived Human Liver Mesenchymal-Like Cells). Les HLSC expriment les mêmes marqueurs mésenchymateux que les CSM de la moelle osseuse et des marqueurs hépatocytaires comme l'albumine, l'AFP ainsi qu'un petit pourcentage des cellules qui expriment les CK 8 et 18. Cependant ces dernières sont capables de se différencier en ostéoblastes et en cellules endothéliales mais pas en adipocytes [314]. Les ADHLSC expriment les mêmes marqueurs mésenchymateux que les CSM de la moelle osseuse et des marqueurs hépatocytaires comme l'albumine et le CYP3A4 mais ne sont pas capables de se différencier vers les lignées mésenchymateuses [315].

Les CSM selon leur origine (moelle osseuse ou tissus adipeux) bien qu'elles puissent être induites à se différencier vers les 3 lignages mésenchymateux, présentent une sorte de pré-engagement des CSM du tissu adipeux vers la différenciation adipocytaire alors que pour les CSM de la moelle osseuse, la différenciation ostéogénique et chondrogénique est plus facile [316].

Il semble donc qu'il existe une pré-programmation de la différenciation, spécifique à chaque tissu, en fonction de l'origine des CSM. Dans la perspective d'une application en thérapie cellulaire il serait donc plus avantageux d'utiliser des CSM qui proviennent du même tissu que l'organe à restaurer.

➤ CSM de foie fœtal humain

Les CSM du foie fœtal humain partagent les mêmes caractéristiques que les CSM de la moelle osseuse tout en étant plus prolifératives [313]. Elles sont également multipotentes et possèdent des caractéristiques immunomodulatrices [317-319]. Ainsi Dan et al ont mis en évidence des CSM dans le foie fœtal humain âgé entre 74 et 108 jours de gestation nommés hFLMPC (human fetal liver multipotent progenitor cell). Ces hFLMPC n'expriment pas de marqueurs hépatocytaires comme l'albumine, α -fetoprotéine, HNF1 α , HNF3 β et le HNF4 α . La transplantation de ces cellules dans un modèle murin Rag-/- γ c-/- induit leur différenciation en

hépatocytes *in vivo*, confirmée 30 jours après la transplantation [320]. Dans cette logique, nous avons isolé sur du foie fœtal humain de 12 à 13 semaines de grossesse une population de cellules souches mésenchymateuses (MSC), FL-CSM (fetal liver MSC), stable en culture et clonogénique. Ces FL-CSM sont multipotentes à l'échelon clonal avec une tendance spontanée à la différenciation en muscle lisse et qui expriment à l'état natif des marqueurs hépatiques comme le HNF1 α , HNF1 β et le HNF3 β [321].

Des travaux sont actuellement en cours mais ces cellules pourraient être une source pour la thérapie cellulaire hépatique mais des problèmes d'approvisionnement et des problèmes éthiques restent au premier plan.

Tableau 13 : Différenciation hépatique *in vitro* des CSM de différentes origines [322]

Source /Espèce	Protocole de différenciation	Marqueurs hépatocytaires/ fonctions
MSC de la moelle osseuse		
Homme	acide linoléique + DEX + acide ascorbique + EGF + matrigel + HGF + FGF4	HNF1 α , ALB, AFP, CK18, TTR, CK8 Synthèse de l'urée, coloration acide périodique de Schiff (PAS), internalisation du LDL, activité des cytochromes
Homme	Transplantation des MSC dans des rats intoxiqués à l'alcool allylique	ALB, AFP, CK18
Homme	EGF+FGF2/HGF+FGF2+nicotinamide / OSM+ DEX	AFP, ALB, CK18, TAT, TDO2, G6P, HNF4 α , Synthèse de l'urée, coloration PAS, internalisation du LDL, activité des cytochromes
Homme	FGF4+HGF+DEX	AFP, ALB, CK18, HNF1 α , CYP1A1, CYP2B1 Synthèse de l'urée, coloration PAS, activité des cytochromes
Homme	Co-culture avec le foie du rat, HGF/ OSM + DEX + nicotinamide	AFP, CK18, ALB, TDO2, TAT, AAT,HNF4 α Synthèse de l'urée, coloration PAS
Rat	HGF+DEX	AFP, ALB
Rat	Transplantation dans des souris intoxiquées au CCL4 et au diméthylNitrosamine	Amélioration de la fibrose hépatique grâce aux MSC
MSC du cordon ombilical		
Homme	HGF+DEX+ITS/IMDM+OSM+DEX	AFP, TAT, ALB, CK18 Internalisation du LDL
Homme	HGF+DEX+ITS/OSM+DEX	ALB, CK18, AFP, TAT, HGF, PEPCK. CPS-1 Internalisation du DIL-LDL
Homme	EGF+FGF2/HGF+FGF2+nicotinamide /OSM+DEX	AFP, ALB, CK18, TAT, TDO2, G6P, HNF4 α Synthèse de l'urée, coloration PAS, internalisation du LDL, activité des cytochromes
Homme	FGF4+HGF+FBS	CK18, ALB, AFP Synthèse de l'urée, coloration PAS
MSC du tissu adipeux		
Homme	DEX+EGF+acide ascorbique +HGF+OSM	AFP, ALB Synthèse de l'urée, internalisation du DIL-LDL
Homme	EGF+FGF2/HGF+FGF2 +nicotinamide/OSM+DEX	ALB, AFP, CK18, CYP3A4, CYP2E1, c/EBP β , HNF4 α
Homme	MSC du tissu adipeux CD105+ triées par MACS HGF+FGF1+FGF4 / OSM+DEX	ALB, AFP, TTR, HNF4 α , TDO2, CK18, TTR Détoxification de l'ammoniaque, coloration PAS, internalisation du DIL-LDL
MSC du liquide amniotique		
Homme souris	HGF+OSM+DEX+FGF4	ALB, AFP, HNF4 α , MDR1 Synthèse de l'urée

➤ *Conversion directe de fibroblastes en cellules hepatocyte-like*

En 2011, un nouveau type cellulaire est publié par deux équipes dans Nature. Ces cellules sont des cellules *hepatocyte-like* induites (iHep) à partir de fibroblastes de souris en surexprimant deux combinaisons différentes de facteurs de transcription [323, 324]. Ces iHep ont même été transplantées avec succès dans un foie de souris préparé [323, 324]. D'une part, Huang et *al.* ont démontré l'induction d'une conversion directe des fibroblastes de queue de souris en iHep prolifératifs et fonctionnels après transduction par GATA4, HNF1 α , FOXA2 et de shARN p19^{ARF}. Ces iHep ainsi générés présentent une morphologie épithéliale, expriment des gènes et certaines fonctions hépatiques. Après transplantation, ils ont repeuplé les foies endommagés des souris et restaurer la fonction hépatique déficiente permettant la survie de la moitié des souris [324]. D'autre part, Sekiya et *al* démontrent que la transduction des fibroblastes embryonnaires et adultes de souris par HNF4 α et FOXA1, FOXA2 ou bien FOXA3 induit leur conversion en iHep [323]. Ces derniers étaient également prolifératifs, fonctionnels et permettaient de sauver certaines souris après transplantation. Cependant, l'effet réparateur de ces cellules *in vivo* après transplantation dans les souris malades reste partiel avec des iHep générés qui ne sont pas identiques aux hépatocytes. Très récemment, deux équipes, dont l'une des précédentes, ont pu transdifférencier des fibroblastes humains cette fois, en hiHep (hepatocyte-like humain induit) [325, 326]. Enfin, une autre équipe vient de décrire la possibilité de reprogrammer des fibroblastes humain en hiHep à l'aide d'ARNm modifiés exprimant des facteurs de transcription déterminés [327].

1.7.3. Optimiser le site d'injection

Une des explications des résultats médiocres obtenus après transplantation d'hépatocytes est la faible efficacité d'intégration des cellules dans le parenchyme hépatique.

L'optimisation du site d'injection pourrait être une solution pour améliorer l'efficacité de la

greffe cellulaire. Les cellules sont principalement transplantées en intra-portal afin d'éviter une translocation dans les poumons et la circulation systémique [180]. Plus de 70% des hépatocytes transplantés par cette voie restent dans l'espace porte et les sinusoides ce qui active le système immunitaire, les cellules de Küpffer et les neutrophiles induisant ainsi leur élimination rapide sous 24 à 48 heures [328]. Toujours dans les modèles animaux, l'implantation des cellules transplantées est limitée par le nombre de cellules transplantées [191, 246, 329]. En effet, un trop grand nombre de cellules injectées provoque une thrombose portale responsable de décès ou d'hypertension portale mais en parallèle l'augmentation du nombre de cellules injectées augmente la prise de greffe [330]. Ainsi le site d'injection joue un rôle clef. En effet, une injection intra-portale chez le rat permet un plus grand passage intra-hépatique par rapport à l'injection intra-splénique avec un rapport d'environ 90% vs 60% [246, 330]. Cette différence est due à l'emprisonnement des cellules transplantées par voie splénique dans la rate, qui serait d'environ 30 à 40% [246]. Par contre, après une transplantation intra-portale, un passage systémique est plus fréquent [246]. Pour ce qui est de l'injection splénique, qui semble moins morbide même si un risque hémorragique est toujours présent, elle diminuerait le taux de thrombose portale pour une même quantité de cellules injectées [246, 331]. Un consensus n'existe pas de ce point de vue et il faudra explorer d'autres sites d'injection permettant une meilleure accessibilité pour les cellules transplantées au parenchyme hépatique et moins de risques de thrombose vasculaire. D'autres pistes sont en cours d'investigation comme la voie surrénale, sous-cutanée, pancréatique, péritonéale et intramusculaire [213, 332-334]. Le potentiel thérapeutique de la transplantation ectopique d'hépatocytes a été démontré dans des modèles animaux d'hémophilie et de déficience en acide ascorbique [213, 332, 333]. Cependant, des études plus poussées pour évaluer le potentiel de la transplantation ectopique quant à la viabilité et la faisabilité en clinique, sont encore nécessaires [180, 213].

1.7.4. La préparation du foie receveur

En vue de créer un environnement adéquat pour les cellules transplantées, plusieurs modèles visent à détruire ou à léser les hépatocytes natifs du foie receveur. La destruction des hépatocytes natifs induit un signal régénératif dans l'organe hôte permettant une augmentation de la prise de greffe cellulaire. Néanmoins, ces modèles ne sont pas pour la plupart transposables chez l'homme.

1.7.4.1. Chimiothérapie et autre toxique

➤ Régénération après destruction hépatique

Un grand nombre de toxines peuvent causer des dégâts hépatiques avec mort cellulaire ce qui permet de déclencher un signal régénératif dans le parenchyme hépatique (Figure 23 et Tableau 15). Contrairement à une hépatectomie partielle, ces “ modèles hépatotoxiques de régénération du foie » sont plus faciles à réaliser et d'une plus grande pertinence clinique chez l'animal. En effet, l'hépatectomie partielle laisse tout les acini hépatiques restants intact, alors que les hépatotoxines peuvent être utilisées pour induire sélectivement des lésions nécrotiques centrolobulaires ou périportales et peuvent donc mieux simuler certaines maladies du foie. Par contre, la toxine induit la régénération du foie de façon difficilement standardisée, systématisée ou même reproductible [51] car les effets locaux et systémiques de la toxine dépendent de la dose, du mode d'administration, de l'espèce animale testée, de leur âge, de l'état nutritionnel et d'autres facteurs comme la gestation. Ainsi, l'étendue de la blessure du foie et de la régénération peut varier en conséquence [335]. La réponse du foie est souvent dans une large mesure déterminée par la dose et le mode d'administration. Par exemple, l'insuffisance hépatique aiguë peut être induite par augmentation de la concentration de la toxine, avec déclenchement d'une cirrhose par l'administration de doses répétées. Les toxines peuvent interférer directement avec des mécanismes cellulaires et moléculaires de la régénération du foie, par exemple, en

endommageant les membranes (interruption de l'interaction entre les facteurs de croissance et les récepteurs membranaires), diminution de l'expression des gènes et des protéines synthétisées, des réactions inflammatoires (augmentation de la production de cytokines et de radicaux libres oxygénés) ou de l'activation des cellules non parenchymateuses [336]. Enfin, dans ces modèles, le processus d'atteinte hépatique et de réparation sont étroitement liés [337]. Il est donc difficile de prévoir l'étendue précise des dommages causés au foie et d'éviter une variabilité inter-individuelle. Le tétrachlorure de carbone (CCl₄), la retrorsine, la D-galactosamine, l'éthanol, la thioacétamide et l'acétaminophène sont les hépatotoxines qui ont été le plus souvent utilisées pour induire expérimentalement la régénération du foie. Mais tous ces hépatotoxiques ne peuvent en aucun cas s'appliquer à une pratique clinique. Nous ne détaillerons que les plus utilisés :

-Le tétrachlorure de carbone (CCl₄) est l'hépatotoxine classique, induisant dans le foie des lésions cellulaires par l'apparition de métabolites toxiques cytochrome P450-dépendants. Dans cette réaction, la première étape est la formation de très nombreux radicaux de trichlorométhyle qui déclenchent une peroxydation lipidique ce qui endommage la membrane des hépatocytes. Ceci est accompagné de l'activation des cellules de Küpffer avec libération de cytokines, de radicaux libres oxygénés et l'activation des granulocytes neutrophiles. Les lésions toxiques hépatiques aiguës, peuvent être induites par voie orale, intrapéritoneale ou sous-cutanée de CCL₄. Cette forme de dommage du foie est caractérisée par une nécrose centrolobulaire, suivie d'une régénération [51]. Chez des souris (22-28 g), il est possible d'induire une lésion hépatique, par une seule injection intrapéritonéale de CCl₄ (0,1 ml / kg de poids corporel) après dilution dans l'huile de maïs [338]. Ainsi, dix jours après transplantation, le nombre d'hépatocytes greffés dans les foies de souris traitées au CCL₄ était 4 fois plus élevé que chez les souris contrôles non traitées [339]. La même dose, dissoute dans de l'huile d'olive, est recommandée chez le rat [340]. Par rapport à une hépatectomie partielle, la régénération du foie

après l'intoxication par le CCL4 chez les rats est retardée de 48h [341]. La potentialisation de l'hépatotoxicité du CCL4 peut être obtenue soit par l'administration intragastrique soit par une administration simultanée de phénobarbital [342, 343]. Dans ces conditions, la transplantation d'hépatocytes de rat chez des rats ayant une cirrhose décompensée irréversible induite par ces deux produits chimiques permet une amélioration des fonctions métaboliques et une amélioration de la survie des animaux [344, 345].

-La D-galactosamine exerce son hépatotoxicité en provoquant une carence intracellulaire des métabolites d'uridine, probablement conjointement avec d'autres facteurs [346]. Elle a été utilisée pour induire l'insuffisance hépatique fulminante et déclencher une régénération du foie. Chez le rat (170-350 g) l'administration se fait par injection intrapéritonéale de 0,5 à 3 g / kg de poids corporel [347, 348] et chez les lapins ou les chiens, l'injection intraveineuse à dose adaptée, dans une solution de dextrose de 5% à un pH de 6,8 conduit à une lésion hépatique aiguë [349]. Par comparaison avec CCL4, la régénération du foie avec la D-galactosamine induit une régénération considérablement plus faible, malgré des courbes similaires de cinétique de synthèse d'ADN et de mitose des hépatocytes [350].

-Le Thioacétamide (TAA) est une hépatotoxine qui est classiquement utilisée pour l'induction de cirrhose hépatique ou d'encéphalopathie hépatique aiguë. Chez les rats (150-300 g), une injection intrapéritonéale de 250 mg / kg de poids corporel de TAA pendant plus de 2-3 jours, induit une régénération hépatique conséquente et a été utilisée dans le passé [351, 352].

-Les intoxications par l'acétaminophène ou paracétamol sont parmi les causes les plus fréquentes d'insuffisance hépatique aiguë en clinique [353]. Dans des circonstances normales, l'acétaminophène subit une biotransformation dans le foie par une combinaison de glucuronidation et sulfatation. Il est par la suite excrété par les reins. Après un surdosage, ces voies de dégradation peuvent être dépassées et l'acétaminophène sera métabolisé par le cytochrome P450. Cela conduit à la formation de N-acétyl-benzoquinonéimine, toxique qui

provoque l'apoptose et une nécrose par formation de radicaux libres et activation des cellules de Küpffer [354]. Chez le rat, l'administration intragastrique d'acétaminophène à une dose de 750-1400 mg / kg de poids corporel provoque une hépatite aiguë réversible accompagnée d'une nécrose hépatocellulaire massive [355, 356]. Chez les grands animaux tels que les chiens et les cochons, l'induction enzymatique doit être précédée par du phénobarbital pendant trois jours suivi par l'administration intragastrique d'acétaminophène à des doses de 1-4 g kg / de poids corporel [357, 358]. Étant donné que la présence et l'efficacité des cytochromes P450 hépatiques varie d'une espèce à l'autre et en fonction de l'âge, il est difficile de concevoir un modèle animal expérimental standardisé de toxicité hépatique induite par l'acétaminophène [353].

-Les effets de l'éthanol sur le foie par hépatotoxicité directe avec induction de la régénération ont été étudiés en détail. Les études publiées restent très disparates, en particulier dans le mode et la durée d'administration de l'éthanol [359]. Des investigations sur l'effet de l'éthanol dans la régénération du foie ont montré qu'après hépatectomie partielle, la régénération d'un foie traité par l'éthanol était retardée et même diminuée [360]. D'autres études ne parviennent pas à montrer d'influence de l'éthanol sur la régénération hépatique [361, 362]. Cependant, ces études étaient caractérisées par une durée sensiblement plus courte d'administration de l'éthanol avec probablement une toxicité aiguë hépatique plus faible et une composante plus importante des effets de la stéatose [363].

-Le traitement des hépatocytes à la rétrorsine, un alcaloïde, induit l'arrêt de leur prolifération en phase G2 et G2/M du cycle cellulaire sans altérer leur potentiel métabolique [364]. Laconi et *al.* ont rapporté que la transplantation syngénique des hépatocytes dans le foie de rats déficients en dipeptidyl-peptidase de type IV (DPPIV-) et traités avec rétrorsine pourrait atteindre 95% de chimérisme et restaurer une fonction hépatique normale [195]. Cette transplantation de 1 à 2 millions d'hépatocytes exprimant la DPPIV ou CD26 chez des rats

déficients pour cette même protéine et ayant subi un traitement à la rétrovirus suivi d'une hépatectomie de 70%, résulte en une prise de greffe importante de l'ordre 40 à 60% chez les rats femelles et plus de 95% chez les rats mâles [195]. Ceci est probablement dû à un stimulus régénératif favorisant exclusivement les cellules transplantées. Il est donc possible de repeupler le foie grâce à un système impliquant un inhibiteur de mitose et un signal régénératif pour les cellules de l'organe hôte. Des études menées chez la souris et le rat montrent que le traitement simultané des foies à la rétrovirus et au CCL4 provoque une destruction des hépatocytes natifs et un blocage de leur prolifération permettant ainsi une prolifération préférentielle des cellules transplantées et un repeuplement de 50% du foie receveur par ces dernières [180, 365]. Une combinaison de la rétrovirus avec des hormones ou des facteurs de croissance peut être également utilisée. L'hormone T3 a pu induire un signal régénératif dans les foies de rats préalablement traités à la rétrovirus [366]. Ainsi des cellules souches/progénitrices hépatiques transplantées chez des rats traités par la rétrovirus ont pu se différencier en hépatocytes matures *in vivo* et participer à un repeuplement partiel du foie receveur [367].

Tableau 14 : Modèles pharmaco-toxiques de régénération hépatique chez l'animal [51]

Toxique	Model animal	Référence
Tétrahydrochloride	Souris	Brucoleri et al. [338]
	Rats	Liu et al. [368]
	Chiens	Voros et al. [369]
	Cochons	Alp et al. [343]
	Singes	Kawakami et al. [370]
Retrovirus	Souris	Zhou et al. [364]
	Rats	Picard et al. [371]
D-Galactosamine	Souris	Koniaris et al [372]
	Rats	Grun et al. [348]

	Chiens	Diaz-Buxo et al. [373]
	Cochons	Ho et al. [374]
	Lapins	Blitzer et al. [349]
Thioacétamide	Rats	Albrecht et al. [351]
	Lapins	Metzner et al. [375]
Acétaminophène	Souris	Gardner et al. [376]
	Rats	Leonard et al. [356]
	Chiens	Francavilla et al. [357]
	Cochons	Miller et al. [358]
	Lapins	Shakoori et al. [377]
Ethanol	Souris	Diehl et al. [363]
	Rats	Morales-Gonzales et al. [359]

➤ Régénération par hyperplasie compensatoire directe

La régénération du foie non prédédée par une perte de cellules du foie est une hyperplasie compensatoire directe pouvant être induite par l'injection intraveineuse de nitrate de plomb [378]. Contrairement à la régénération du foie après hépatectomie partielle, l'hyperplasie compensatoire directe n'est pas associée à une augmentation de facteurs de croissance hépatocytaires (HGF) ou de facteurs de croissance transformés (TGF), mais à une augmentation significative de facteurs de nécrose tumorale (TNF-a). Ainsi des traitements par dexaméthasone et divers inhibiteurs du TNF-a comme par exemple, l'adénosine ou la pentoxyphylline, conduisent à l'inhibition directe de l'expression du TNF-a et de la croissance du foie. Ce phénomène soutient l'hypothèse que le TNF-a déclenche la prolifération des hépatocytes primaires par mitogénèse [379, 380].

1.7.4.2. Génotoxicité du foie receveur

Pour promouvoir la prolifération des cellules transplantées dans l'organe receveur, un avantage sélectif ou prolifératif doit être mis en place [238]. Les modèles de génotoxicité du foie receveur sont des modèles animaux correspondant à certaines maladies métaboliques héréditaires du foie humain. Ainsi, le modèle murin de cholestase intrahépatique familiale progressive (souris *mdr2*^{-/-}) caractérisé par une toxicité hépatocytaire d e à l'absence de phospholipides dans la bile, permet la transplantation d'hépatocytes *mdr2*^{+/+}. La transplantation induit un repeuplement stable de 21% du foie receveur en parallèle à un rétablissement de la sécrétion des phospholipides [381]. Le modèle murin de la tyrosinémie de type 1 caractérisé par la d fici nce de l'enzyme FAH (Fumarylacetoac tate hydrolase) a été utilisé par plusieurs équipes afin de localiser les hépatocytes FAH⁺ transplantés et suivre le repeuplement du foie receveur [241, 382]. La transplantation de seulement 1 000 hépatocytes est suffisante pour repeupler le foie déficient ce qui montre que dans ce modèle, les hépatocytes transplantés ont eu un avantage prolifératif par rapport aux cellules du foie receveur. Un modèle de souris transgénique a été développé en introduisant le gène de l'enzyme urokinase (uPA) sous contrôle du promoteur de l'albumine [239]. Le repeuplement du foie de ces souris par des hépatocytes normaux a été démontré [192, 239, 240, 383]. De même, une xénotransplantation d'hépatocytes de rats dans ce modèle induit une reconstitution complète du foie malade [240].

1.7.4.3. Radiothérapie

Le traitement du foie receveur par de la radiothérapie, seule ou associée à une hépatectomie ou à une ischémie hépatique transitoire (embolisation), permet d'augmenter l'efficacité de la transplantation [194, 384].

En effet dans les modèles animaux, l'irradiation hépatique à faible dose a montré un intérêt pour améliorer la prise de greffe et la prolifération des hépatocytes. Cet effet est probablement médié par une altération, observée dès 24h post-irradiation, des cellules endothéliales sinusoïdales du foie. Il passe aussi par la suppression de l'activation de la phagocytose des cellules de Küpffer. Ces atteintes semblent très transitoires car l'élimination dans la circulation de l'acide hyaluronique, qui est réalisée par les cellules endothéliales sinusoïdales, est ralentie après irradiation hépatique pour revenir à des niveaux de pré-irradiation en 7 jours [385]. Par conséquent, le moment optimal pour la transplantation d'hépatocytes après irradiation serait entre 1 et 7 jours.

Pour ce qui est des doses d'irradiation hépatique, elles doivent être très modérées et vont, dans la littérature, de 15 à 50 Gy chez les rongeurs [180]. Ces doses ont donné lieu à un blocage temporaire du cycle cellulaire natif (arrêt dans la phase G1 S). Ce blocage a favorisé la prolifération préférentielle des hépatocytes transplantés d'autant plus que cette irradiation est associée à un signal de régénération, conduisant à un important repeuplement du foie de l'hôte [385-387]. Cependant, l'irradiation hépatique active les cellules étoilées, ce qui à long terme peut entraîner une fibrose hépatique induite par irradiation [388]. Il faut savoir qu'il y a de grandes différences entre les espèces concernant la réponse à une irradiation hépatique. En effet, les rongeurs sont généralement plus résistants. Chez le singe cynomolgus, une seule dose de 10 Gy d'irradiation hépatique serait suffisante pour augmenter la prise de greffe d'hépatocytes porcins après transplantation [385]. Cependant, avec une irradiation hépatique supérieure à 40 Gy, la dose devient toxique, les animaux développent une insuffisance hépatique radioinduite et meurent dans les 6 semaines [385]. Le foie humain est très radiosensible. Une seule dose de 30 Gy d'irradiation du foie entier peut entraîner une défaillance hépatique par lésions endothéliales et l'apparition de maladie veino-occlusive. D'autre part, une zone restreinte du foie peut être irradiée avec des doses aussi élevées que 90 à

100 Gy, sans conséquence néfaste sur tout l'organe, ce qui indique que le volume du foie irradié est important dans le processus. A ce jour, l'irradiation hépatique n'a pas encore été utilisée comme une méthode de préparation du foie avant transplantation d'hépatocytes en clinique. Les données disponibles sur l'irradiation du foie pour les nourrissons de moins de 2 ans ne sont pas encourageantes, car ils ont plus de risque de développer des tumeurs du système nerveux central et des déformations de la cage thoracique même à faible dose [180]. Pour les enfants de plus de 2 ans, des irradiations simples de 3-5 Gy sont certainement faisables si elles sont effectuées dans certaines régions localisées du foie, mais leur capacité à favoriser le repeuplement hépatique après greffe par des cellules reste inconnue [180].

La sécurité du patient doit être la principale préoccupation de toute procédure thérapeutique. Il est actuellement considéré que l'irradiation hépatique, comme moyen de préparation du foie avant transplantation cellulaire, doit être donnée en une seule fraction et confinée à une partie d'un lobe de foie, une sélection rigoureuse des patients étant tout aussi importante. Les patients cirrhotiques devant être exclus car leur foie est plus sensible aux rayonnements. Ce type de préparation pourrait donc être proposé dans le cadre d'études cliniques chez des patients présentant des maladies dans lesquelles les effets thérapeutiques des cellules transplantées peuvent être facilement mesurés et dans la mesure où ils seraient aussi des candidats à la transplantation d'organes pour permettre un rattrapage. Si ce type d'études met en évidence un intérêt dans la préparation du foie cela permettra certainement d'ouvrir de nouvelles possibilités dans le domaine de la transplantation d'hépatocytes.

1.7.4.4. Hépatectomie partielle

L'induction de la régénération du foie par hépatectomie partielle dépend de la réduction de la fonctionnalité et de la masse du foie. Le modèle d'hépatectomie des 2/3 chez le rat conçu il y a plus de 80 ans par Higgins et Anderson a largement été exploré [389]. Chez le rat, la masse du

foie représente environ 4% du poids du corps, avec une anatomie bien adaptée car les proportions des lobes restent constantes avec des pédicules vasculaires longs et indépendants d'un lobe à l'autre. Le lobe droit est plus profond et représente environ 38-40%, le lobe gauche environ 30%, le lobe caudé environ 8-10% et le lobe carré, qui se divise presque en deux parties, représente environ 20% de la masse totale du foie (Figure 24a). Après avoir effectué une laparotomie médiane, la première étape consiste à mobiliser le foie par libération des ligaments des lobes droit et gauche. En raison de la longueur de l'hile vasculaire, les lobes droit et gauche du foie peuvent être réséqués en bloc. Après avoir serré la ligature, les lobes vont pâlir. Ce changement de couleur qui correspond à une ischémie permet la résection (Figure 24b, c). Il est important de ne pas laisser de tissu hépatique résiduel ischémique in situ, car il peut entraîner la libération de médiateurs et influencer l'efficacité de la régénération. D'autre part, la ligature ne doit pas être placée trop près des veines hépatiques communes car cela pourrait réduire la lumière de la veine cave inférieure. Après résection des lobes, l'abdomen est fermé en deux couches. Les avantages de l'induction de la régénération du foie par l'hépatectomie des 2/3 chez le rongeur correspondent donc à sa stabilité anatomique et sa reproductibilité. Après résection d'une plus grande quantité, par exemple 90% du foie, les complications de l'insuffisance hépatique aiguë tels que l'encéphalopathie ou les coagulopathies peuvent apparaître avec augmentation du taux de mortalité [390]. L'induction de la régénération du foie débute par l'apparition de synthèse de l'ADN qui devient maximale 24 h après une hépatectomie partielle. Enfin, le foie résiduel n'a pas été directement manipulé et peut donc se régénérer sans être exposé à des phénomènes de nécrose ou d'inflammation simultanée du foie.

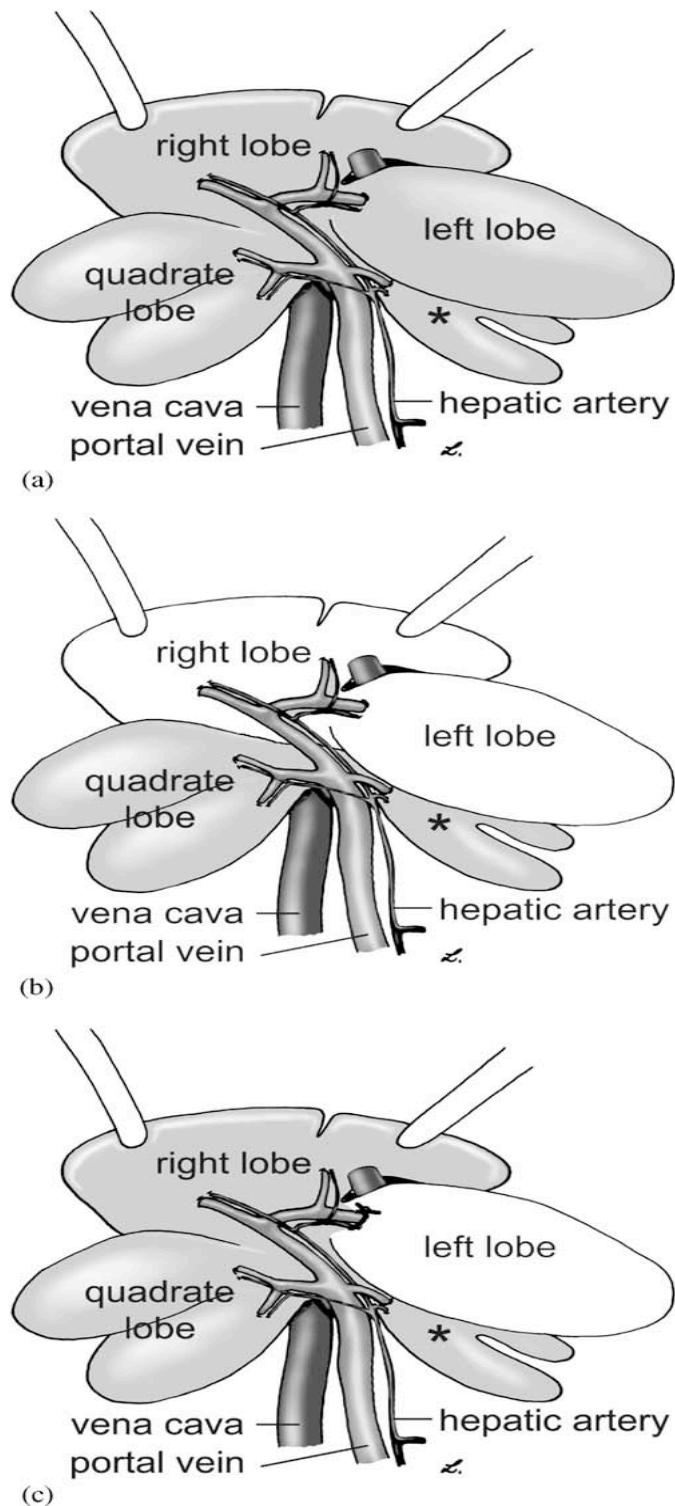


Figure 24 : Modèles chirurgicaux de la régénération du foie de rat: (a) anatomie du foie de rat, (b) hépatectomie partielle des 3/4, (c) ligature portale, branche gauche correspondant à une hépatectomie des 1/3. Sont représentés en gris le parenchyme restant fonctionnel du foie et en blanc le parenchyme ischémié non fonctionnel du foie [51]. L'hépatectomie des 2/3 est donc le

modèle de référence pour l'étude de la régénération hépatique par hypertrophie compensatrice. Suite à l'hépatectomie, les segments hépatiques restants s'hypertrophient permettant ainsi à l'organe de restaurer sa masse et sa fonctionnalité initiales. Les hépatocytes périportaux se mettent à proliférer en premier lieu. Cette prolifération s'étendra plus tard vers les hépatocytes péricentraux [146]. En moyenne, chaque hépatocyte effectue une à deux divisions. Par la suite, chaque type de cellules non parenchymateuse entre à son tour en division.

La cinétique de régénération post-hépatectomie diffère selon l'espèce [146]. Le pic de régénération, correspondant au moment pendant lequel un nombre maximal de cellules entrent en même temps en division, est plus ou moins connu selon l'espèce. Chez la souris, le pic de régénération a lieu 48 heures après l'hépatectomie [146, 391]. Tandis que chez le rat, ce pic a lieu entre 20 et 24 heures après une hépatectomie [392, 393]. Chez le chien, le pic de régénération a lieu seulement 72 heures après la résection [357].

Une hépatectomie des 2/3 est capable de déclencher un signal régénératif hépatique suffisant pour permettre une prise de greffe [146], cependant cette intervention ne peut en aucun cas s'appliquer chez l'homme en pratique clinique. Elle reste donc un modèle purement expérimental pré-clinique.

1.7.4.5. Ligature et embolisation portales sectorielles

Le principe de la régénération du foie après ligature ou embolisation d'une branche de la veine porte est maintenant un concept bien établi dans la chirurgie des tumeurs du foie. Il remonte aux observations de Frerichs en 1861, qui a noté que la thrombose d'une branche de la veine porte conduit à l'atrophie du lobe correspondant alors que les autres lobes s'hyperthrophient [394].

➤ La ligature portale sectorielle

Elle correspond à une approche moins invasive que l'hépatectomie partielle. En effet, cette

technique est utilisée en routine dans l'arsenal thérapeutique des cliniciens pour induire une régénération hépatique afin de compenser une chirurgie hépatique majeure [395, 396]. La morbidité de cette approche reste faible. Plusieurs études ont montré que la ligature portale partielle induit un stimulus prolifératif des hépatocytes transplantés permettant ainsi une correction plus efficace des déficits métaboliques [193, 397, 398]. Une ligature portale partielle réalisée avant la transplantation des hépatocytes est plus efficace qu'une ligature effectuée 24 heures après la transplantation. Ce même si l'on transplante 20 fois plus d'hépatocytes dans le foie non préparé [399]. Notre équipe a même montré qu'une ligature portale de 70% induisait une prolifération hépatocytaire avec régénération hépatique dont le pic se situe entre 24 et 48 h après la ligature [400]. Nous avons également, sur un modèle primate, effectué des ligatures portales partielles suivies d'une auto-transplantation de 400 millions d'hépatocytes génétiquement modifiés. Le taux de prise de greffe a été estimé à 2% de la masse hépatocytaire totale [401].

La ligature portale partielle stimule la régénération hépatique avec augmentation de la prise de greffe mais les résultats de la prolifération cellulaire et de prise de greffe restent décevants. L'une des raisons qui peut être avancée pour expliquer ces résultats insuffisants est la reprise de la vascularisation portale à distance. En effet, une étude menée chez le porc a démontré la recanalisation complète du territoire portal ligaturé [402]. Cette recanalisation a également été aussi rapportée en clinique humaine [396].

➤ **L'embolisation portale**

Quand elle est permanente ou non résorbable, c'est une procédure sûre, largement utilisée en chirurgie pour induire une hypertrophie du lobe restant avant une hépatectomie majeure. Comme la ligature, elle évite le développement d'une insuffisance hépatique due à un volume hépatique insuffisant suite à la resection. Basée évidemment sur le même principe que la ligature,

elle est encore moins invasive car la préparation du foie se fait par voie endovasculaire radiologique. Elle a ainsi très largement pris le dessus en chirurgie hépatique carcinologique sur la ligature portale [395, 403, 404]. Dans un modèle de primate, notre équipe a démontré qu'une occlusion des branches portales sectorielles droites (environ 50% du foie) permet d'améliorer considérablement la prise de greffe dans le foie non embolisé, suite à une transplantation autologue et d'induire un repeuplement de 10% du lobe non embolisé [172]. Pour rendre ce protocole encore moins invasif, notre équipe a opté pour remplacer l'embolisation portale permanente par une embolisation portale réversible effectuée à l'aide d'une poudre résorbable, dans le même modèle préclinique de primate [405, 406]. Ce matériel résorbable utilisé pour emboliser les branches portales proximales permet également d'augmenter de manière significative la prolifération des hépatocytes et d'induire une hypertrophie du lobe non embolisé. L'utilisation d'un tel procédé présente tous les avantages car pour une efficacité similaire sur le déclenchement du signal régénératif, la résorption du matériel permet une recanalisation complète de la veine porte en moyenne 13 jours après l'embolisation portale réversible avec un processus inflammatoire réversible [406]. Le suivi à long terme montre que 6% du foie receveur est constitué par les hépatocytes transplantés à 3 mois post-greffe [405, 406]. Il est très probable que l'importance du signal régénératif dépende de la qualité du foie et des éléments vasculaires. Ainsi, les atteintes préalables du foie receveur comme la cirrhose et/ou le diabète peuvent affecter l'efficacité de la régénération induite par l'embolisation portale réversible notamment.

Toutes les méthodes exposées de préparation du foie avant transplantation d'hépatocytes afin d'induire un signal régénératif pour optimiser la prise de greffe ont une efficacité. Mais la plupart de ces méthodes restent non réalisables dans des conditions cliniques soit à cause des risques qu'elles présentent soit car elles ne sont pas encore assez évaluées.

L'embolisation portale anatomique proximale non résorbable ou résorbable est clairement la

plus avantageuse car très peu invasive et efficace. Cependant, le principe de l'embolisation portale proximale (obstruction des grosses branches sectorielles) limite considérablement le volume de parenchyme disponible pour la greffe d'hépatocytes car pour obtenir un signal régénératif suffisant, il faut emboliser environ 50 à 70% du foie.

1.7.5. Traitements adjuvants

1.7.5.1. Facteurs de croissance

De nombreux facteurs de croissance peuvent induire une régénération hépatique. Chez la souris, l'injection du KGF (Keratinocyte Growth Factor) permet 48 heures plus tard une augmentation de 40 fois de la prolifération hépatocytaire comme démontré par la mesure du taux d'incorporation du BrdU (Bromodéoxyuridine), qui est un nucléoside de synthèse utilisé pour la détection des cellules qui prolifèrent [407]. Un traitement sur 5 jours par l'HGF (5 mg/Kg/jour) chez la souris induit une augmentation de plus de 140% de la masse hépatique. Le pic de prolifération suite à l'injection d'HGF est atteint sous 48 heures [408]. Chez le rat, 5 injections d'HGF à une dose de 500 mg/Kg sont capables d'induire une régénération hépatique [409]. Dernièrement, notre équipe a montré qu'une injection d'HGF préalable à la transplantation d'hépatoblastes humains à des souris nouveau-nées induit le transfert des hépatoblastes des espaces portes au parenchyme hépatique [245]. Bien que les résultats obtenus suite à l'utilisation d'HGF semblent intéressants, ils doivent cependant être considérés avec précaution. Etant donné la quantité d'HGF nécessaire pour induire une régénération hépatique chez l'animal, ceci semble difficilement applicable chez l'homme. En effet, l'administration à forte dose de facteurs de croissance présente des risques de carcinogenèse [409, 410].

1.7.5.2. Vasodilatateurs et autres

Une bonne transplantation correspond finalement à une arrivée la plus importante possible de cellules à transplanter au niveau des sinusoides hépatiques [191, 328]. Ainsi 80 à 90% des cellules sont retrouvées dans le foie à J2 [328]. L'un des problèmes réside dans le fait que la présence des cellules greffées (deux fois plus grosses que les globules rouges) dans le réseau vasculaire déclenche des signaux inflammatoires avec embolie. Cette obstruction vasculaire quand elle est sinusoidale, est responsable de phénomènes d'ischémie et de nécrose hépatique [411]. Le rôle des régulateurs vasculaires et l'homéostasie de la microcirculation hépatique est donc crucial [412]. Ces médiateurs sont très complexes et font intervenir des vasoconstricteurs tels que l'angiotensine (AGT), l'endothéline (EDN), la norépinephrine mais aussi des vasodilatateurs tels que la nitroglycérine (NTG), le monoxide d'azote (NO), les α -bloquants adrénergiques et autres, qui permettent une augmentation de la prise de greffe [413]. Ainsi le contrôle de la vasodilatation dans le foie permet l'augmentation du pourcentage des cellules capables d'atteindre les sinusoides hépatiques améliorant ainsi la prise de greffe et diminuant les perturbations circulatoires. Cette vasodilatation par la NTG notamment améliore la prise de greffe sans augmenter les risques de translocation intrapulmonaire des hépatocytes [413]. Notre équipe a mis en évidence que le nombre des hépatocytes *mdr2* (+/+) greffés dans un modèle de souris *mdr2* (-/-) traitée par NTG était significativement plus élevé que celui des souris témoins, avec présence d'un plus grand nombre d'hépatocytes au niveau des sinusoides distaux et une correction plus importante du trouble métabolique [414]. La fibrose intrahépatique à 3 mois a également été réduite de manière significative chez les souris traitées NTG [414]. Cette approche utilisant les vasodilatateurs pourrait être utile dans l'optimisation de la transplantation d'hépatocytes chez les patients atteints de maladies hépatiques. Plusieurs autres approches médicamenteuses sont utilisées pour améliorer la prise de greffe dans les modèles précliniques. L'un des plus importants a pour objectif de contrôler l'inflammation du foie suite à la

transplantation des cellules pour éviter leur élimination rapide et massive par le système immunitaire. Chez des rongeurs, une déplétion des neutrophiles ou des cellules de Küpffer améliore la prise de greffe des cellules [411, 415]. Récemment, il a été démontré que 6 heures après une transplantation syngénique d'hépatocytes, de nombreux gènes de cytokines responsables de l'activation des neutrophiles et des macrophages comme le TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α) et l'IL-6 (Interleukine-6) ont été activés [180]. Ces cytokines pourraient constituer des cibles à contrôler pharmacologiquement pour améliorer la prise de greffe [411]. Durant les premières étapes d'élimination des hépatocytes transplantés, par le système immunitaire, les voies de la cyclooxygénase (COX-1 et COX-2) sont activées [416]. Ces dernières sont impliquées dans la synthèse des prostanoïdes comme la prostaglandine, prostacycline et le thromboxane. L'administration de médicaments capables d'inhiber spécifiquement les prostaglandine-endopéroxyde synthases stimule la sécrétion de facteurs protecteurs pour les hépatocytes, par les cellules stellaires comme l'HGF, VEGF et les métalloprotéinases régulant ainsi le remodelage et l'amélioration de la prise de greffe cellulaire [416]. Il a été démontré chez le rongeur qu'une injection intraveineuse des MSC de la moelle osseuse de rat n'entraîne pas l'activation du système immunitaire notamment le complément et les lymphocytes T, évitant l'élimination des MSC allogéniques ou syngéniques injectées [417]. Ceci rend prometteur l'utilisation des cellules *hepatocyte-like* obtenues à partir de MSC.

D'autre part il a été montré que les hépatocytes expriment des facteurs ayant une activité pro-coagulante qui contribuent à la perte des cellules transplantées et *in vitro* l'administration de la N-acétyl-L-cystéine inhibe l'activation de la coagulation [418].

Enfin, des lésions réversibles de l'endothélium sinusoïdal pourraient faciliter le passage des hépatocytes de l'espace péri-portal vers le parenchyme hépatique. Chez le rat, un traitement par le cyclophosphamide ou la doxorubicine, agents induisant des lésions au niveau des cellules endothéliales sinusoïdales hépatiques, mais aussi probablement sur les autres types cellulaires,

accélérerait l'entrée des cellules greffées et améliore la prise de greffe des hépatocytes dans le parenchyme hépatique [384, 419].

Durant cette introduction nous avons largement présenté les possibilité d'amélioration de la thérapie cellulaire hépatique avec une certaine efficacité mais d'autres approches innovantes doivent être explorées. Ainsi mon travail de thèse a eu pour but l'amélioration des résultats de la thérapie cellulaire hépatique et j'ai travaillé sur deux approches complémentaires concourant à cet objectif:

- Le développement d'une nouvelle méthode de préparation du foie receveur
- Le développement d'une source cellulaire alternative aux hépatocytes

2. OBJECTIF DE MON TRAVAIL DE THESE:

2.1. Optimiser la preparation hépatique dans un modèle préclinique

Le but de ce travail est en premier lieu, de tester un nouveau concept de préparation du foie receveur en mettant au point et en évaluant le procédé permettant de le mettre en œuvre.

➤ Nouveau concept de l'embolisation portale volumétrique (EPV)

Comme nous l'avons discuté dans l'introduction, le préconditionnement du foie est essentiel à l'efficacité et la qualité de la prise de greffe avec notamment la nécessité d'un signal régénératif au sein du foie receveur qui le site optimal pour la transplantation des hépatocytes même si le site d'injection reste très discuté (injection portale, splénique, intrapéritonéale...) [180, 328, 420]. Le succès de la transplantation d'hépatocytes dans de nombreux modèles animaux a encouragé une évolution vers des essais cliniques [173, 187, 213, 421-423], qui ont démontré la faisabilité et la pertinence de cette approche, avec une bonne sécurité et une bonne tolérance pour le patient mais des résultats insuffisants [180]. Le retour à la recherche préclinique et le développement de nouveaux protocoles de transplantation de cellules, de thérapie génique et de préparation du foie receveur sont essentiels.

Jusqu'à ce jour, l'embolisation portale segmentaire définitive ou résorbable de 50% du foie à transplanter semble être la meilleure solution en pratique clinique pour obtenir une bonne régénération avec un risque acceptable pour le patient [172, 180]. Cette technique est d'ailleurs largement utilisée en routine pour le traitement des métastases hépatiques [48, 403, 424]. Néanmoins il ne reste qu'environ 30 à 40% de l'arbre vasculaire portal du foie comme voie d'entrée des hépatocytes transplantés [172]. Le «volume hépatique restant», volume de foie dans lequel les hépatocytes vont être transplantés est donc très faible ce qui favorise très certainement des phénomènes d'hypertension portale relative et de thrombose vasculaire. En effet, pour un même flux portal, il ne reste que 30% des gros troncs portes disponibles [425].

Par ailleurs, toutes les analyses sur la régénération hépatique privilégient un mécanisme sinusoïdal du signal régénératif [144, 426, 427].

Devant ces deux constations nous avons conçu un nouveau modèle d'embolisation portale qui doit permettre de déclencher un signal régénératif dans tout le foie, le plus distalement possible (embolisation distale et non proximale) tout en préservant un maximum de « l'arbre vasculaire portal », et plus particulièrement les gros troncs, optimisant ainsi le lieu du signal régénératif et le volume de répartition des hépatocytes transplantés.

Cette nouvelle approche (figure 25) correspondrait à une embolisation portale volumétrique (EPV) et non plus anatomique (c'est-à-dire d'un segment anatomique du foie) [47].

Nous avons donc dans ce travail évalué cette nouvelle embolisation volumétrique qui devrait induire un signal régénératif distal, là où les hépatocytes doivent s'intégrer, et préserver un maximum de gros troncs vasculaires portaux, tout en restant cliniquement acceptable. La procédure consiste donc en une embolisation distale partielle de tout le foie répartie de façon aléatoire dans les veines présinusoïdales à l'aide de microsphères inertes [425].

Avantages anticipés de l'embolisation portale volumétrique:

- Déclencher un signal régénératif dans la totalité du volume du foie de façon homogène, modérée: régénérer, sans altérer la fonction hépatique
 - S'affranchir de la résection segmentaire et sa morbidité
 - Préserver un maximum de territoire parenchymateux pour la greffe cellulaire
 - Augmenter la quantité de cellules injectées sans thrombose portale grâce à la préservation de l'arbre portal
 - Préserver un maximum l'axe vasculaire intervenant dans le déclenchement du signal régénératif

- Préserver un maximum de l'arbre portal proximal pour diminuer l'hypertension portale relative après greffe cellulaire
- Faisable par radiologie interventionnelle simple

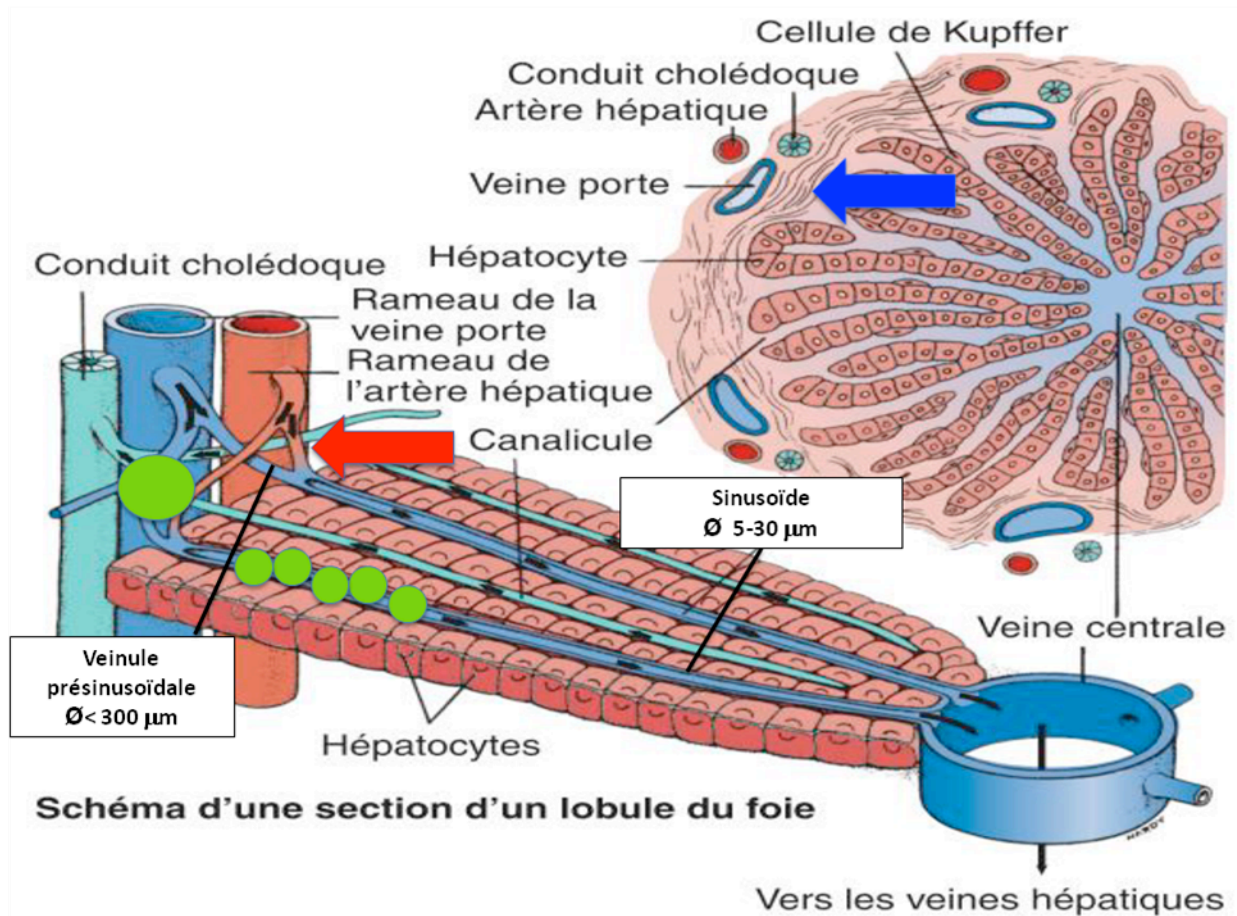


Figure 25 : Schématisation du lobule hépatique et de vaisseaux sinusoides hépatiques support du concept d'embolisation volumétrique par microsphères inertes (représentées en vert) [52].

L'objectif est donc d'augmenter la quantité de cellules transplantées tout en déclenchant le signal régénératif homogène, distal et dans tous le foie, d'où le concept d'embolisation Portale volumétrique (EPV).

Nous avons donc réalisé un premier temps de mise au point et de faisabilité afin de déterminer les conditions optimales de l'embolisation portale volumétrique par des microsphères inertes (polyester) chez la souris, sans altération du parenchyme hépatique (nécrose) et sans morbidité pour l'animal. Enfin, dans notre modèle de souris, nous avons évalué l'effet de cette préparation sur la prise de greffe.

2.2. Evaluation d'une nouvelle source d'hépatocytes à transplanter

A sein de notre équipe, nous avons par un travail thèse commun avec Mademoiselle Hoda El-Kehdi, explorer une nouvelle source de cellules *hepatocyte-like*. En effet, les problèmes d'efficacité de la transplantation d'hépatocytes en remplacement de la greffe orthotopique fait aussi intervenir la faible résistance des hépatocytes aux conditions de culture et de cryopréservation *in vitro* qui ont sérieusement ralenti le développement clinique de cette technique. Face à ces limitations, il est donc nécessaire d'explorer d'autres pistes dont l'amélioration de la qualité de la suspension cellulaire sans négliger son accessibilité, sa résistance à la cryopréservation, ses capacités prolifératives, son innocuité et son potentiel de différenciation en hépatocytes fonctionnels. De nombreuses cellules souches/progénitrices ont été étudiées pour leur capacité d'implantation et de fonction *in situ* dans le traitement de la fibrose hépatique [428, 429], du foie endommagé [430], de l'insuffisance hépatique [431, 432], des maladies en phase terminale [433, 434] et des maladies métaboliques hépatiques [435, 436]. L'utilisation en clinique des cellules souches embryonnaires ainsi que les cellules souches pluripotentes induites (iPSC) présente des problèmes de sécurité et d'éthique pour les cellules embryonnaires [437, 438], néanmoins une partie de l'équipe explore ces cellules à fort potentielle. D'un autre côté, les cellules souches somatiques sont considérées comme des candidates moins risquées avec un potentiel dans le développement de la thérapie cellulaire du foie mais leur capacité réelle à se différencier en hépatocytes-like fonctionnels reste à évaluer,

c'est la partie cellulaire de mon travail de thèse. Par ailleurs, le foie et plus précisément les cellules d'origine hépatique, restent la source cellulaire la plus logique pour isoler de telles cellules dans l'objectif de traitement des maladies hépatiques.

Nous avons donc choisi d'explorer la capacité de différenciation en hépatocytes fonctionnels *in vitro* des cellules souches mésenchymateuses (CSM) du foie fœtal humain (FL-CSM). Ces CSM peuvent être plus intéressantes que leurs homologues adultes, étant donné la diminution de la capacité de différenciation avec l'âge [439]. En effet, les CSM fœtales sont moins engagées vers une voie de différenciation et, de plus, possèdent une meilleure capacité de prolifération de même qu'une sénescence plus tardive lorsqu'elles sont maintenues en culture [313, 440]. Nous avons démontré que les FL-CSM natives expriment certains facteurs de transcription hépatiques [321] et avons évalué leur capacité de greffe et de différenciation *in situ* après transplantation chez des souris immunodéprimées.

3. MATERIELS, MÉTHODES ET RESULTATS

3.1. Mise au point et évaluation de l'intérêt de l'embolisation portale volumétrique

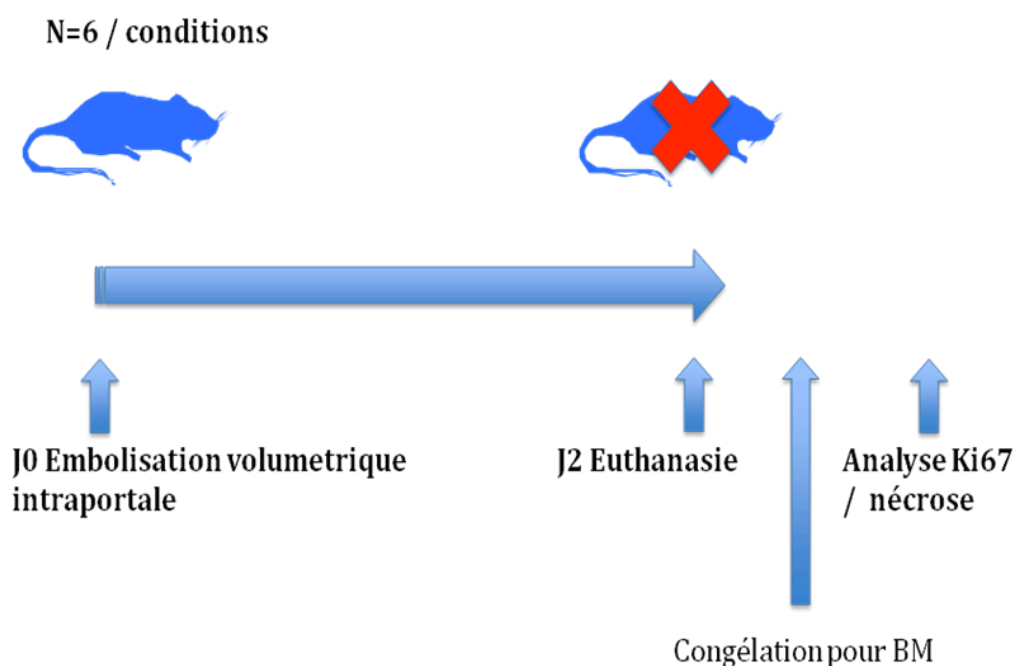
3.1.1. Explication de l'article et résultats

Plusieurs étapes ont dû être validées pour atteindre notre objectif :

1. Mise au point d'un protocole permettant de quantifier la régénération hépatique chez la souris de manière reproductible en utilisant le Ki67.

Les souris utilisées pour les expérimentations étaient des souris C57Bl6 issues de l'élevage du laboratoire. Trois cent cinquante neuf souris ont été nécessaires pour réaliser ce travail. Les microsphères utilisées étaient en polystyrène, colorées, calibrées entre 10 μm et 200 μm (diamètre d'un sinusoiide qui a la capacité à se dilater en présence d'une hypertension portale jusqu'à 200 μm). Le diamètre moyen d'un hépatocyte est de 30 μm , il a une capacité à se déformer pour s'intégrer au parenchyme hépatique après transplantation)

Schema du plan expérimental de la mise au point des conditions d'EPV :



2. Mise au point de l'embolisation volumétrique homogène à l'aide des microsphères inertes pour obtenir:

1. Une répartition homogène des microsphères à l'entrée des sinusoides

Dans un premier temps, nous avons déterminé la vitesse d'injection durant l'embolisation portale :

Nous avons utilisé de 10^6 à 8×10^6 microsphères de $10 \mu\text{m}$ de diamètre qui ont été perfusées à un débit de environ $20 \mu\text{l/s}$, c'est-à-dire $600 \mu\text{l}$ en 30 secondes, et de environ $3,3 \mu\text{l/s}$, c'est-à-dire $600 \mu\text{l}$ en 3 minutes, avec trois souris dans chaque groupe test. Pour une vitesse d'injection de $20 \mu\text{l/s}$ la répartition des microsphères se fait de façon segmentaire dans le foie étant même responsable d'ischémie segmentaire distale par obstruction sinusoidale (figure 26).

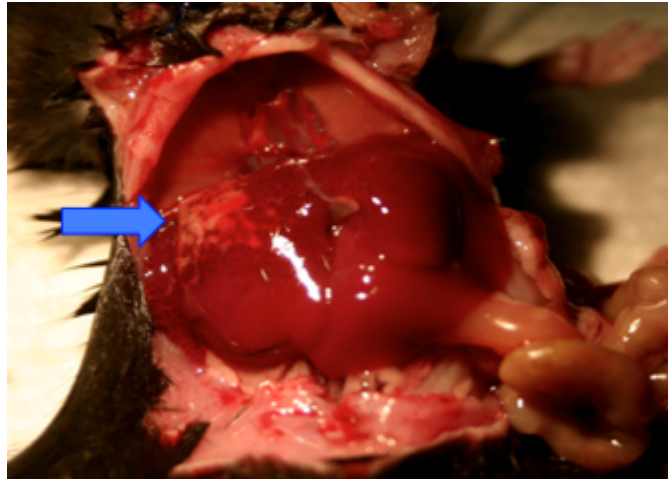


Figure 26: Photographie d'une souris C57Bl6 avec embolisation sectorielle par 8 millions de microsphères de $10 \mu\text{m}$ secondaire à une répartition non homogène des billes suite à une injection rapide ($20 \mu\text{l/s}$) responsable de nécrose par ischémie sinusoidale.

Par contre une injection lente de 3,3 μ l/s conduit à la répartition homogène et distale de microsphères déterminée par l'analyse histologique, ce qui correspond à une répartition volumétrique (figure 1 article transplantation). Toutes les injections ultérieures ont donc été effectuées avec un débit de 3,3 μ l/s.

Déroulement de la procédure

Sous anesthésie générale, après incision médiane, la veine porte des souris a été exposée puis ponctionnée à l'aide d'un cathéter de lymphographie pour injection de la solution de microsphères. Les souris étaient sacrifiées à J2 pour prélèvement hépatique et étude d'une part de la répartition des microsphères (coloration HES) et d'autre part de la régénération hépatique (en immunohistochimie avec révélation de l'anticorps anti-Ki67 qui colore les noyaux des cellules en division en brun foncé).

- Résultats obtenus avec des microsphères de 15 μ m de diamètre

Nous avons débuté les injections avec 500 000 jusqu'à 14 millions de microsphères de 15 μ m. En dessous de 4 millions de microsphères injectées, les microsphères étaient présentes dans les sinusoides mais en quantité insuffisante pour créer un signal de régénération hépatique. A partir de 4 millions de microsphères injectées, les microsphères avaient tendance à s'agglutiner en amont pour obstruer les branches sinusoidales et les branches plus proximales de la veine porte de façon segmentaire ce qui provoquait une embolisation anatomique distale. Par conséquent, des plages de nécrose ischémique segmentaire sont apparues (Figure 27 A), d'autant plus larges et diffuses que le nombre de microsphères injectées était important, ce qui induisait de la régénération hépatique dans les zones non ischémiques donc non embolisées (Figure 27 B).

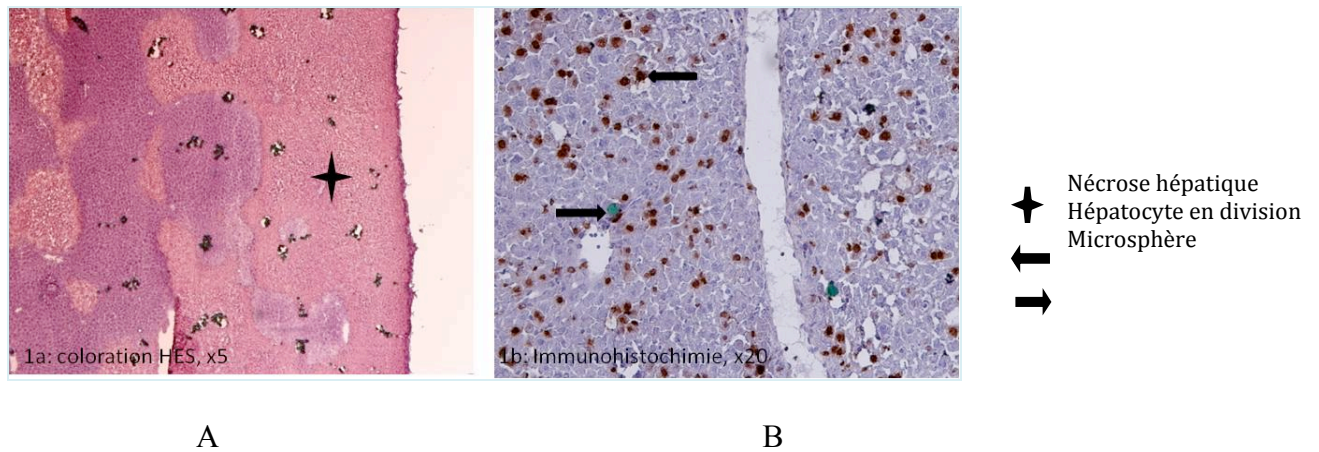


Figure 27 A et B: Coupes de foie 48h après injection de 14 millions de microsphères

Pour permettre d'induire une régénération hépatique diffuse sans provoquer d'ischémie, il faut injecter un grand nombre de microsphères pour obstruer une quantité suffisante de sinusoides, tout en évitant l'accumulation du matériel embolisé dans les branches portales, responsable d'ischémie. Nous avons alors mis les microsphères en suspension dans une solution plus visqueuse de Voluven®. Grâce à une meilleure suspension de ces microsphères, nous avons imaginé qu'elles seraient entraînées à un niveau plus distal.

- Résultats obtenus après injection de 4 à 16 millions de microsphères de 15 µm de diamètre diluées dans du Voluven®

Plusieurs essais ont été réalisés avec différents produits et il est apparu qu'en diluant les microsphères avec du Voluven®, solution utilisée en clinique pour le remplissage macromoléculaire, nous avons amélioré la répartition des microsphères au niveau des sinusoides jusqu'à 4 millions de microsphères injectées (figure 28).

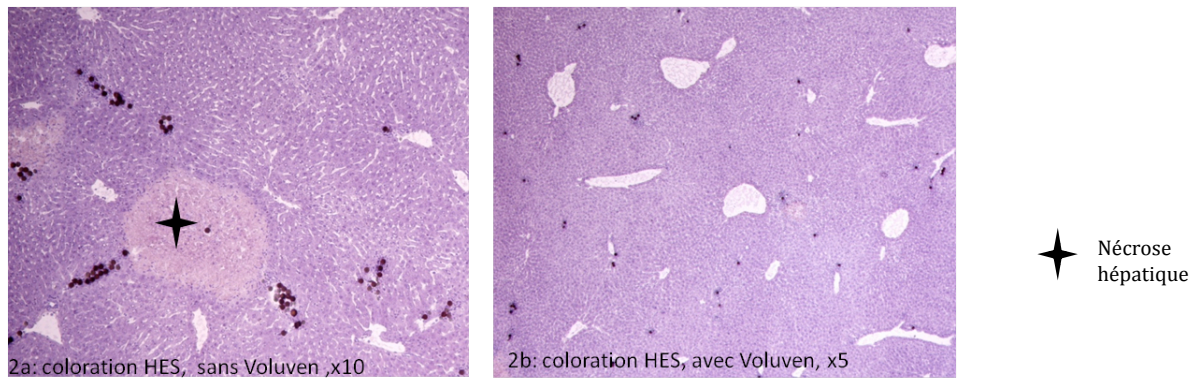


Figure 18: Coupes de foie 48h après injection de 4 millions de microsphères

L'obstruction sinusoïdale résultante était encore insuffisante pour induire de la régénération hépatique. A partir de 8 millions de microsphères injectées, nous n'avons pas pu éviter l'obstruction des branches portales par le matériel embolisé. Pour optimiser à nouveau la répartition des microsphères dans les sinusoïdes dans l'ensemble du parenchyme hépatique, nous avons injecté des microsphères de plus petit calibre.

- Résultats obtenus après injection de 4 à 16 millions de microsphères de 10 μ m de diamètre diluées dans du Voluven®

En diminuant le calibre des microsphères, passant de 15 à 10 μ m, nous avons cette fois optimisé la répartition du matériel d'embolisation au niveau sinusoïdal sans accumulation dans les branches portales jusqu'à 8 millions de microsphères injectées (Figure 29a). Les souris ont bien toléré l'injection et nous avons observé en immunohistochimie des hépatocytes dont le noyau était marqué, preuve d'une régénération hépatique (Figure 29b).

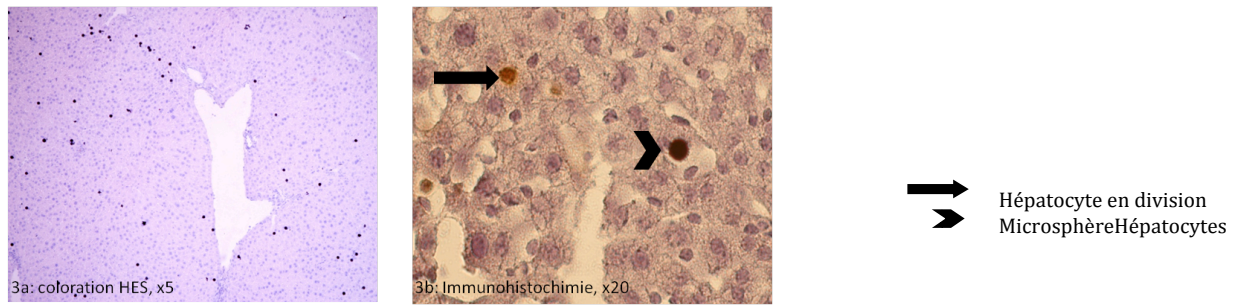


Figure 29: Coupes de foie 48h après injection de 8 millions de microsphères

- Pour ce qui est des plus gros calibres de microsphères (50 à 200 μm), une bonne repartition n'a jamais été possible car elles restaient bloquées dans l'aiguille de ponction portale qui ne peut pas dépasser 29G ($\varnothing 320 \mu\text{m}$) car trop de risques hémorragiques chez la souris dont le calibre de la veine porte est très réduit.

2. Une bonne tolérance des souris après embolisation (sans nécrose, sans hémorragie, sans altération de la fonction hépatique)

Lors de l'évaluation de la répartition il a été démontré que des très grandes quantités de billes injectées entraînaient une augmentation des hémorragies portales, de la nécrose hépatique et du nombre de décès (tableau 1, article de Transplantation).

Ainsi en fonction du nombre de microsphères injectées, la nécrose et la régénération (taux de Ki67) sont inversement proportionnelles et nous avons fait le choix de la condition permettant le maximum de régénération sans nécrose, sans hémorragie ou sans décès. Selon nos résultats, une embolisation de 8×10^6 microsphères de $10 \mu\text{m}$ à $3,3 \mu\text{l/s}$ dans un volume total de $0,6 \text{ ml}$ par une aiguille de 29G ($324 \mu\text{m}$) est la meilleure condition chez la souris C57Bl6 (figure 1, article de Transplantation).

Etude de la régénération hépatique après embolisation volumétrique (tableau 1, article de Transplantation).

- Déterminer les conditions optimales de l'injection des microsphères en termes de quantité et de calibre des microsphères pour obtenir une obstruction des sinusoides de façon diffuse sans nécrose ou altération hépatique histologique .
- Quantifier la régénération hépatique maximum que l'on peut induire après embolisation volumétrique portale sans altération hépatique majeure à moyen et long terme.

Ainsi après injection de 8×10^6 microsphères de 10 μm diluées dans 0,6 ml de Voluven® à 3,3 $\mu\text{l/s}$ chez la souris C57Bl6, qui correspond à la meilleure condition testée (10, 15, 30, 50, 100, 200 μm avec plusieurs gradient de concentration) sans nécrose ou altération du foie, nous avons calculé un taux de régénération hépatique moyen de 4,9% dans l'ensemble du parenchyme. Ce taux de régénération est inférieur à celui obtenu après hépatectomie des deux tiers, « gold standard » actuel de la régénération hépatique avec 20% de régénération. Néanmoins, cette régénération est présente dans l'ensemble du foie et pas uniquement dans le foie restant contrairement à une hépatectomie ou une embolisation portale classique. Ainsi en le rapportant au volume équivalent, nous aurions environ 14,3% de régénération avec notre embolisation volumétrique, ce qui est du même ordre de grandeur que l'hépatectomie des 2/3.

3. Evaluer l'innocuité à long terme pour le foie de souris pour la meilleure condition

Nous avons, pour la meilleure condition chez la souris C57Bl6, définie comme étant une embolisation portale de 8×10^6 microsphères de 10 μm à 3,3 $\mu\text{l/s}$, réalisé des analyses biologiques et histologiques du foie à long terme (J21).

Durant cette expérimentation, 9 souris ont été nécessaires, 3 souris témoins non opérées, 6 souris embolisées pour EPV. Trois souris ont été euthanasiées à J2 et à J21 pour analyse macroscopique, biologique (albumine, bilirubine, alanine aminotransférase (ALAT), aspartate aminotransférase (ASAT), gammaglutamyl transférase (GGT), phosphatase alcaline (PAL)) et histologique pour les conditions optimales à répartition distale et homogène.

Ainsi à court et long terme, les souris ayant subi une EPV n'ont montré aucun signe de souffrance ou anomalie macroscopique et histologique par rapport au groupe témoin, à l'exception de la présence de microsphères colorées dans le foie embolisé. Par contre sur le plan biologique une cytolyse isolée avec une augmentation de l'ALAT (5 fois plus que le groupe témoin) et des ASAT (4 fois plus que le groupe témoin) et aucune différence significative pour les autres tests hépatiques à J2 après EPV par rapport au groupe témoin. A J21 cette cytolyse hépatique s'améliore nettement même si elle persiste à environ 2 fois la valeur témoin.

4. Analyse anatomique de la répartition des microsphères par injection de résine d'alginate intrahépatique :

Un protocole d'injection d'alginate coloré, qui polymérise au contact du calcium, est mis au point afin de visualiser la répartition des billes embolisées à J0 et J5 (Figures 4-5, article de Transplantation). Ces microangiographies ont été effectuées pour cartographier les branches portales pour avoir une analyse anatomique des effets de l'embolisation. Une préparation de la souris est nécessaire avant l'injection d'alginate pour laver les vaisseaux contenant du sang, elle est réalisée par la réalisation d'une perfusion intracardiaque de sérum physiologique hépariné durant quelques minutes. Ainsi, brièvement après une anesthésie générale des souris, la veine cave inférieure est coupée et le foie entier comme tous les autres organes est perfusé par ponction et injection continue dans le ventricule gauche par 0,9% de NaCl hépariné durant plusieurs minutes pour éliminer complètement le sang des vaisseaux (figure 30). Puis la

véritable angiographie peut débuter après cathétérisation portale et ligature du moignon d'amont. Deux groupes sont définis et l'angiographie est réalisée immédiatement après l'embolisation portale à J0 et 5 jours après EPV en utilisant des hydrogels d'alginate de couleur. Un gel d'alginate rouge (AlgRed) est injecté dans le ventricule gauche pour permettre de visualiser les artères et un d'alginate bleu (AlgBlue) est injecté dans la veine porte pour permettre de visualiser l'arbre portal. L'embolisation a été réalisée chez six souris (groupe 1) avec 8×10^6 microsphères de 10 μm de diamètre en suspension de 0,6 ml de Voluven® lentement comme décrit précédemment, puis par la même tubulure, 1 ml de 2% AlgBlue dans NaCl à 0,9%. L'artère hépatique, via la circulation systémique et la perfusion cardiaque est perfusée avec 3 ml d'AlgRed à 1% dans NaCl à 0,9%. Dans l'autre groupe de six souris sans embolisation (groupe 2), la même procédure d'angiographie est effectuée à J0 et à J5. Les hydrogels AlgRed et AlgBlue colorés ont été préparés et le foie entier fixé et traité comme décrit dans la littérature [441].

L'analyse de ces angiographies met en évidence une répartition distale des microsphères qui semble se faire en deux temps car à J0, un blocage homogène et net dans les troncs portes chez les souris embolisées par rapport aux souris non embolisées (figure 3 article de Transplantation) alors qu'à J5 la coloration, pour le même groupe de souris embolisées, est détectée mais avec des défauts parenchymateux distaux nets correspondant probablement aux territoires lobulaires embolisés (figure 4 article de Transplantation). Il faut aussi remarquer qu'à plus fort grossissement (figure 3 article de Transplantation), il est possible de visualiser à J0 l'artériole hépatique en rouge avec une veine porte embolisée dilatée. A J5 les angiographies prolongées de rouge (figure 4, article de Transplantation) révèlent, via la circulation sus-hépatique, une coloration des territoires embolisés du foie (rouge).

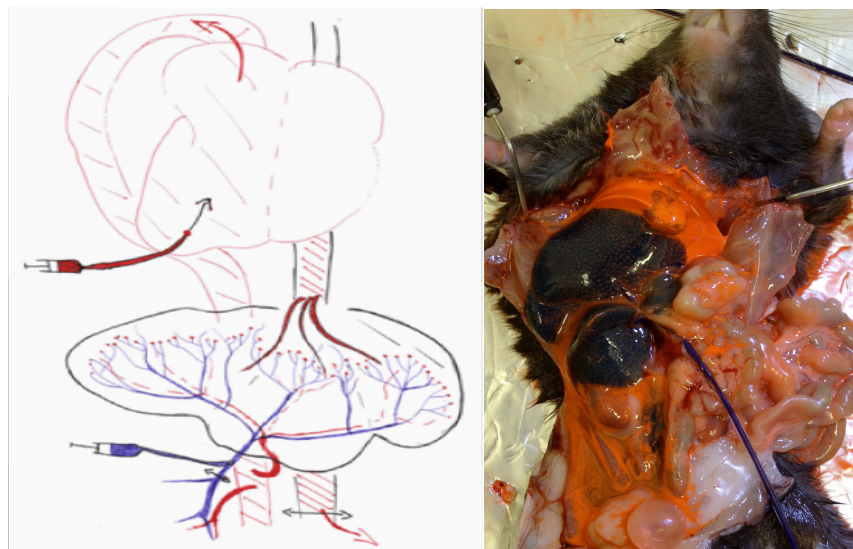


Figure 30: Modèle de perfusion d'alginate après lavage au sérum physiologique des vaisseaux par perfusion cardiaque utilisée dans un deuxième temps pour injection de orange-rouge dans la circulation générale, un cathétérisme de la veine porte pour injection de résine bleu :

5. Etudier la prise de greffe des hépatocytes transplantés après embolisation volumétrique portale dans les meilleures conditions.

Nous avons donc évalué la prise de greffe pour la meilleure condition d'EPV (8 millions de microsphères de 10 μ m diluées dans 0,6ml de Voluven® chez la souris C57bl6).

5. Déroulement de la procédure

L'ensemble de la procédure d'évaluation de la prise de greffe nécessite des souris syngéniques soit 27 souris greffées au total. Les hépatocytes sont isolés par perfusion du foie à la collagénase, puis marqués au Hoechst. Après embolisation volumétrique (figure 31) portale par 8 millions de microsphères de 10 μ m de diamètre effectuée selon la procédure précédemment décrite, nous avons transplanté, par une injection intrasplénique (pour ne pas traumatiser une 2^{ème} fois la veine porte), 1 million d'hépatocytes par souris chez 22 souris et testé des greffons

de 2 et 4 million d'hépatocytes chez 5 souris ~~embolisées~~ **microsphère**. Dans le groupe témoin, 8 souris ont été transplantées sans embolisation préalable mais après une injection portale de Voluven® sans billes. Toutes les souris ont été sacrifiées à J5 pour quantification de la prise de greffe.

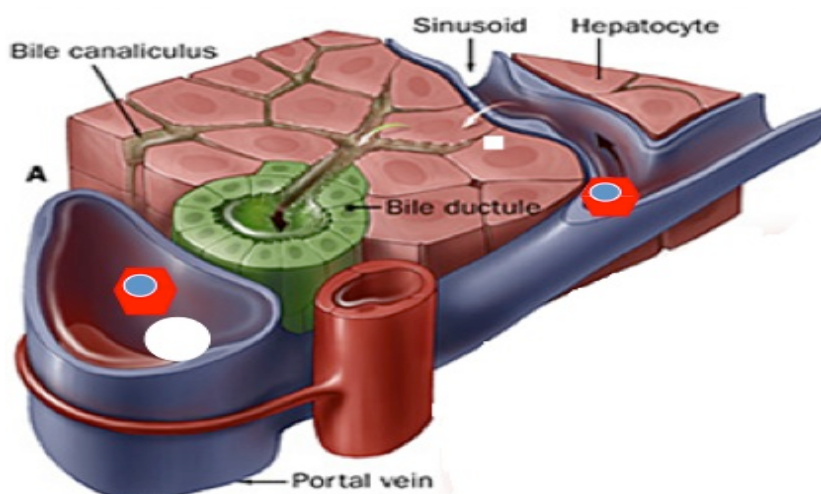


Figure 31 : Schéma d'un lobule hépatique montrant le passage distal des billes (blanches) et des hépatocytes greffés (hexagone rouge) dans le sinusoi.

6. Résultats obtenus

Sur les vingt-sept souris transplantées avec des hépatocytes marqués à l'Hoechst, seules 17 ont bénéficié d'une EPV et 8 souris ont été simplement ponctionnées avec injection portale de 0,6 ml de Voluven® comme témoin. Aucun décès ou hémorragie ne sont survenus au cours des procédures. L'analyse histologique du foie à J5 a permis la détection d'amas d'hépatocytes marqués par le Hoechst (figure 7A article Transplantation) qui sont greffés dans le parenchyme du foie. Le pourcentage médian et (l'intervalle) de la prise de greffe était de 3% (range 2,5 - 3,2%) chez les souris ayant bénéficié de l'EPV (n = 14), alors qu'il était de seulement 0,65% (0,2 - 0,9%) dans le groupe de témoin (n = 8) qui a reçu une injection intraportale de Voluven® (figure 7B article de Transplantation), et cette différence est significative ($p < 0,0001$).

Fait intéressant, le pourcentage de cellules marquées greffées (MARCEL) à J5 dans le parenchyme hépatique semble être proportionnel au nombre de cellules marquées transplantées (TRACEL) à J0. En effet, chez les 5 souris ainsi testées, l'augmentation des TRACEL n'a pas induit de complications et a conduit à une augmentation des MARCEL (figure 7 C article de Transplantation). Enfin, dans le groupe de souris ayant eu une embolisation volumétrique avant transplantation, nous avons constaté que les hépatocytes pouvaient intégrer le parenchyme hépatique pour proliférer au voisinage des microsphères (Figure 32).

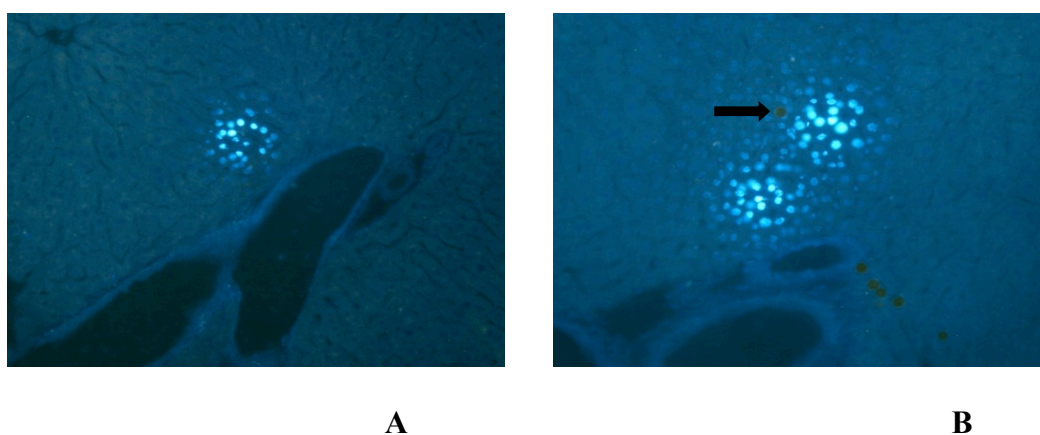


Figure 32: Coupes de foie J5 après transplantation (A: témoin, B: embolisation préalable)

6. Evaluation d'un nouveau marqueur cellulaire « in vivo » le DIR (dioctadecyltetra methyl indotricarbocyanine)

Le Xenolight DIR, Caliper science® infrarouge, est un intercalant membranaire qui nous a permis une analyse macroscopique *in vivo* grâce à l'utilisation d'une caméra *in vivo* (3CCD Digital Camera C7780, Hamamatsu®, Japan). Nous avons pu suivre les cellules greffées lors de l'injection intra-splénique jusqu'à la persistance du signal à J5 post greffe (figure 33). Ce marqueur visible en situation extra-abdominale à J0 et J5, nous a permis de vérifier le passage hépatique, la bonne répartition des hépatocytes greffés et d'évaluer la prise de greffe. Quatre souris ont été transplantées avec des hépatocytes isolés de souris C57BL6 syngéniques et

doublement marquées (XenoLight-DIR + Hoechst), 2 souris dans chaque groupe (EPV et témoin) pour permettre les analyses in vivo et histologique.

Durant la greffe à J0, les cellules marquées ont été détectées par la PDE-caméra, d'abord dans la seringue, puis dans la rate pour finalement atteindre le foie 20 à 30 secondes plus tard (Figure 5 article de Transplantation). In vivo, l'analyse de la fluorescence à J5 a révélé un signal net chez la souris embolisée et transplantée (M3), tandis que le signal de fluorescence était à peine visible pour les souris non-embolisées mais transplantées (M1) ou absent chez les souris témoins (M2) (figure 6A article de Transplantation). Nous avons aussi effectué la mesure en post-mortem sur les organes fraîchement isolés pour obtenir un signal de meilleure qualité (figure 6B article Transplantation). Le signal de fluorescence dans le foie était plus fort chez les souris embolisées avant la transplantation que dans le foie des souris n'ayant pas subid'embolisation avant la transplantation. Les rates des souris receveuses présentaient seulement un signal localisé, correspondant probablement au point d'injection. Le signal de fluorescence n'a été détecté dans les poumons des souris ni dans les rates de souris qui n'ont pas reçu d'hépatocytes. Après enregistrement vidéo un logiciel d'analyse fourni par le laboratoire Hamamatsu® nous a permis de confirmer la présence d'un signal 2 à 3 fois plus important chez la souris embolisée et greffée par rapport à une souris simplement greffée (figure 6 de l'article de transplantation). Néanmoins, la caméra reste très sensible et l'exploration nécessite de minimiser les interférences.

Enfin, l'analyse microscopique comparant des cellules avec double marquage, Hoechst et DIR a été réalisée sur une souris, validant la correspondance histologique du marquage (figure 34)



Figure 33 : Souris analysée par 3CCD Digital Camera C7780, Ha- mamatsu®, Japan à J5 avec de gauche à droite : souris 1 injectée en portal avec 0,7 ml de Voluven® et greffée par 1×10^6 hepatocytes marqués au DIR en splénique ; souris 2 embolisée en portal avec 8×10^6 de billes de $10 \mu\text{m}$ en suspension dans 0,7 ml de Voluven® et greffée par 1×10^6 hépatocytes marqués au DIR en splénique ; souris 3 non greffée mais injectée en portal avec 0,7 ml de Voluven®.

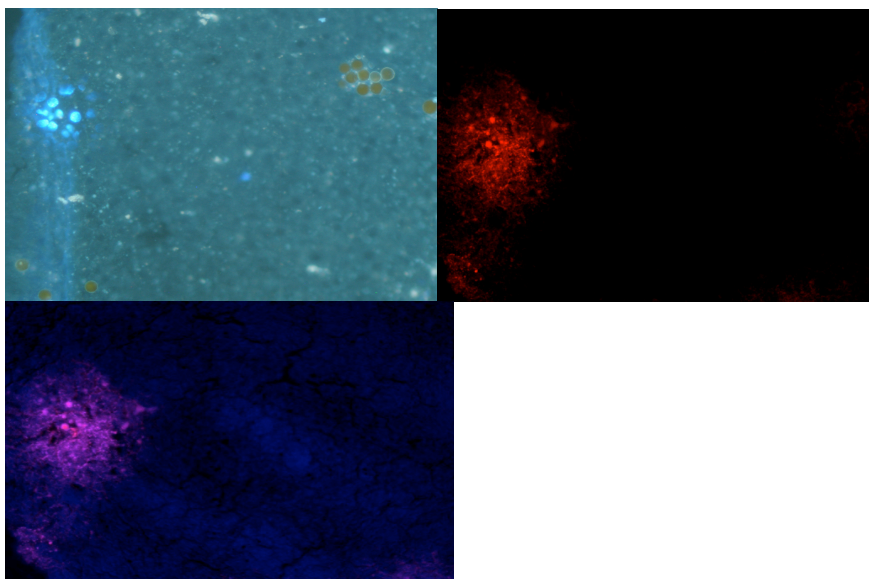


Figure 34 : Image histologique en immunofluorescence d'un cluster d'hépatocytes greffes double marqué au Hoechst (bleu) et au DIR (rouge et violet).

4. ARTICLES THÈSE ET AUTRES TRAVAUX

4.1. Article 1 : *Tranplantation*, accepté le 09 sept 2015

Volumetric portal embolization: a new concept to improve liver regeneration and hepatocyte engraftment

Guillaume Pourcher, Hoda El-Kehdy*, Frederic Kanso, Marie-Therese Groyer-Picard, Martin Gaillard, Olivier Trassard, Istvan Blazsek, Hélène Agostini, Anne Dubart-Kupperschmitt*, Ibrahim Dagher**

* Equally contributing

Structured Abstract:

BACKGROUND AND AIMS: Hepatocyte transplantation has been proposed as an alternative to orthotopic liver transplantation to treat metabolic liver diseases. This approach requires preconditioning of the host liver to enhance engraftment of transplanted hepatocytes. Different methods are currently used in preclinical models: partial hepatectomy, portal ligation or embolization, and radiotherapy or chemotherapeutic drugs. However, these methods carry high risks of complications and are problematic for use in clinical practice. Here, we developed an innovative method called volumetric (distal, partial and random) portal embolization (EPV), which preserves total liver volume.

METHODS: Embolization was performed in the portal trunk of C57BL6 adult mice with polyester microspheres, to ensure a bilateral and distal distribution. The repartition of microspheres was studied by angiographic and histological analysis. Liver regeneration was evaluated by Ki67 labeling. Optimal conditions for EPV were determined and the resulting regeneration was compared with that following partial hepatectomy (70%). Labeled adult hepatocytes were then transplanted and engraftment was compared between embolized (n=19) and non embolized mice (n=8). Engraftment was assessed *in vivo* and histologically by tracking labeled cells at day 5.

RESULTS: The best volumetric embolization conditions, which resulted in the regeneration of 5% of total liver, were 8×10^6 10 μ m microspheres infused with a 29 G needle directly into the portal trunk at 3.3 μ l/s. In these conditions, transplanted hepatocytes engraftment was significantly higher than in control conditions (3 vs 0.65%).

CONCLUSIONS: EPV is a new, minimally invasive and efficient technique to prepare the host liver for cell transplantation.

Keywords: *Volumetric portal embolization, liver regeneration, liver transplantation, microspheres, mouse model, liver embolization, cell therapy of liver diseases*



Transplantation®

TP500297

Original Basic Science—Liver



Volumetric Portal Embolization: A New Concept to Improve Liver Regeneration and Hepatocyte Engraftment

Guillaume Pourcher, MD, PhD,^{1,2,3} Hoda El-Kehdy, PhD,^{1,2,3} Frederic Kanso, MD,^{1,2,3} Marie-Therese Groyer-Picard, PhD,^{1,2} Martin Gaillard, MD,^{1,2,3} Olivier Trassard, PhD,⁴ Istvan Blazsek, PhD,^{1,2,3} Hélène Agostini, MD,³ Anne Dubart-Kupperschmitt, MD, PhD,^{1,2,3} and Ibrahim Daghar, MD, PhD^{1,2,3}

Background. Hepatocyte transplantation has been proposed as an alternative to orthotopic liver transplantation to treat metabolic liver diseases. This approach requires preconditioning of the host liver to enhance engraftment of transplanted hepatocytes. Different methods are currently used in preclinical models: partial hepatectomy, portal ligation or embolization, and radiotherapy or chemotherapeutic drugs. However, these methods carry high risks of complications and are problematic for use in clinical practice. Here, we developed an innovative method called volumetric (distal, partial, and random) portal embolization (VPE), which preserves total liver volume. **Methods.** Embolization was performed in the portal trunk of C57BL/6 adult mice with polyester microspheres, to ensure a bilateral and distal distribution. The repartition of microspheres was studied by angiographic and histological analyses. Liver regeneration was evaluated by Ki67 labeling. Optimal conditions for VPE were determined, and the resulting regeneration was compared with that after partial hepatectomy (70%). Labeled adult hepatocytes were then transplanted, and engraftment was compared between embolized ($n = 19$) and nonembolized mice ($n = 8$). Engraftment was assessed in vivo and histologically by tracking labeled cells at day 5. **Results.** The best volumetric embolization conditions, which resulted in the regeneration of 5% of total liver, were 8×10^6 ten-micron microspheres infused with a 29 G needle directly into the portal trunk at 3.3 μ L/s. In these conditions, transplanted hepatocytes engraftment was significantly higher than that in control conditions (3 vs 0.65%). **Conclusions.** The VPE is a new, minimally invasive, and efficient technique to prepare the host liver for cell transplantation.

(Transplantation 2015;00: 00–00)

Inherited metabolic liver diseases involve genetic defects in hepatic enzymes or other metabolic proteins that are normally synthesized by hepatocytes. Orthotopic liver transplantation is the only curative treatment currently available for life-threatening genetic disorders of the liver and acute liver failure. Hepatocytes transplantation has been explored as an alternative to orthotopic liver transplantation for the treatment of metabolic liver diseases in the past 2 decades.^{1,2}

However, the low efficiency of cell engraftment and insufficient proliferation leads to a poor outcome.² Liver preconditioning is thus crucial to enhance the engraftment and/or the proliferation of donor cells.³ The liver is the optimal site for hepatocytes transplantation.^{3,4} Engraftment in the liver needs 3 steps: deposition in the hepatic sinusoids, migration into the space of Disse, and integration into the liver plates. Less than 30% of transplanted cells ultimately engraft in the recipient liver.⁵

Received 14 March 2015. Revision received 16 August 2015.

Accepted 10 September 2015.

¹INSERM U872, Paul Brousse Hospital, Villejuif, France.

²UMR_S 972, Faculté de Médecine Paris-Sud, Kremlin-Bicêtre, France.

³DHU Hépatolox, Paul Brousse Hospital, Villejuif, France.

⁴Institut Biomédical Bièvre (IRB3, Bièvre Hospital, Kremlin-Bicêtre, France).

This study was supported by INSERM U872. Guillaume Pourcher was supported by NRB (Nouvelles Recherches Biomédicales). Hoda El-Kehdy was supported by A.I.M. Mutual Fund (Lebanon), INSERM U872, and Istvan Blazsek was supported by ICG.

The authors declare no funding or conflicts of interest.

G.P., H.E.-K., A.D.-K., and I.D. equally contributed to this article.

G.P., principal contribution to the acquisition, analysis, and interpretation of the data; and to the drafting of the article. H.E.-K., principal contribution to the acquisition, analysis, and interpretation of the data; and to the drafting of the article. F.K., substantial contribution to the acquisition, analysis, and interpretation of the data. M.-T.G.-P., contribution to the acquisition of data of the transplantation experiments. M.G., contribution to the acquisition of data of the transplantation

experiments. O.T., contribution to the imaging analysis and interpretation of data of embolization experiments. I.B., contribution to analysis and interpretation of data of the microangiography experiments. H.A., statistical analysis and interpretation of data. A.D.-K., principal contribution to the conception and design, analysis and interpretation of data, final approval of the version to be published, and agreement to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the article are appropriately investigated and resolved. I.D., corresponding author and principal contributions to the conception and design, analysis and interpretation of data, final approval of the version to be published, and agreement to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the article are appropriately investigated and resolved.

Correspondence: Ibrahim Daghar or Guillaume Pourcher, Department of Abdominal and Minimally Invasive Surgery Antoine Bichat Hospital, APHP, Faculté de Médecine Paris-Sud 157, rue de la Porte de Trivaux, 92141 Clamart Cedex, France (ibrahim.daghar@aphp.fr; guillaumepourcher@gmail.com).
Copyright © 2015 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

ISSN 0041-1337/15/0000-00

DOI: 10.1097/TP.0000000000001024

The success of hepatocytes transplantation in many animal models has encouraged a shift toward clinical trials,⁶⁻¹¹ which have demonstrated the feasibility and relevance of this approach, together with good tolerance and safety.^{3,12} However, many obstacles remain before the application of this technique for human diseases. The return to preclinical research and the development of new protocols for cell transplantation, gene therapy, and the preparation of the recipient liver are thus essential.

Experiments in animal models have shown that the engraftment of transplanted hepatocytes is improved by damaging endogenous liver cells or impairing their function to make "physiologic" space for transplanted cells and to induce a proliferative stimulus. Some approaches have been evaluated in small or large animals, such as the use of chemotherapeutic drugs,¹³⁻¹⁷ partial hepatectomy,¹⁸ portal ligation,⁵ and partial portal embolization,¹⁹ either in isolation or in combination with repeated cell transplantation and the administration of hepatic sinusoidal vasodilators.^{20,21}

However, some efficient techniques (major hepatectomy, chemotherapeutic drugs) are not acceptable in clinical practice because they carry a high risk.²²⁻²⁴ Segmental portal embolization currently seems to be the best solution in clinical practice to achieve good regeneration with acceptable risk.^{3,25} However, only 30% of the total liver remains after partial embolization or partial hepatectomy²⁵; thus, the remaining hepatic volume in which the transplanted hepatocytes may engraft is small.

Here, we developed a new approach that we call volumetric portal embolization (VPE). This method should induce a regenerative signal and preserve the total liver parenchyma for hepatocytes engraftment while remaining clinically acceptable. The principal procedure consists of a partial and random distal embolization of the presinusoidal vessels, which is performed in the whole portal vascular bed. This contrasts with proximal partial portal embolization, which completely occludes portal circulation in some anatomical segments of the liver.

We first aimed to define the appropriate size and quantity of polyester microspheres and the best injection conditions resulting in a homogeneous distal repartition without necrosis or major liver damage. We subsequently studied liver regeneration and hepatocytes engraftment *in vivo* in a mouse model of VPE.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Four- to 8-week-old C57BL/6 mice (male and female) were purchased from Janvier-Labs.com. Experimentation and breeding were performed at the Kremlin-Bicêtre animal facility. All protocols used for animal studies were approved by the French Ministry of Agriculture and ethical committee.

Hepatectomy

A hepatectomy of approximately 70% was considered the gold standard to trigger liver regeneration as described previously.²⁶⁻²⁸ The removed liver lobe was harvested and used as a control for further immunohistochemical analysis.

Volumetric Portal Embolization

The goal of the method was to trigger liver regeneration without partial hepatectomy or liver damage and to preserve

the entire liver parenchyma for hepatocyte engraftment. Mice were anesthetized intraperitoneally with ketamine/xylazine. The skin of the right upper abdomen and flanks was sterilized, and as for partial hepatectomy, we first performed laparotomy. After exposition of the portal vessels, a 27 or 29 gauge (G) catheter needle (connected to a syringe) was used to puncture the portal vein. Embolization of the main portal vein was performed by injecting microspheres suspended in no more than 600 μ L of hydroxyethylamidon. The microspheres were colored, thus easily detectable on histological sections. The precisely calibrated, nonbiodegradable, polyester microspheres (EZ-TRAC) were purchased from IMT Laboratories (San Francisco, CA). Several microsphere sizes (10, 15, 30, 50, 100, and 200 μ m diameter) and quantities (from 10^3 to 16×10^6) were tested (Table 1). The diameter of the smallest microsphere roughly corresponds to the size of a mouse hepatocyte and that of the largest microsphere corresponds to the larger diameter of presinusoidal veins.^{29,30} Adult C57BL/6 mice (25 g) have approximately 1000 hepatic lobules, which vary substantially in terms of the number and size of presinusoidal veins.^{29,31} we thus used various quantities and size of microspheres to perform embolization.

We sought to determine optimal conditions to obtain the distal and homogeneous repartition of microspheres in the liver, which we refer to as volumetric partial portal embolization. For this purpose and for the analysis of the hepatic regeneration triggered by the VPE, mice were sacrificed 2 days later to evaluate liver regeneration as well as microsphere distribution. In the best VPE conditions, a group of 6 mice was observed at different time points with blood samples (albumin, bilirubin, alanine aminotransferase [ALT], aspartate aminotransferase [AST], γ -glutamyl transferase, and alkaline phosphatase) and histological analysis after euthanasia at day 2 for 3 mice and day 21 for the 3 other mice to assess the good tolerance of the procedure. Those mice were compared with 3 control mice (without VPE) for the blood samples and histological analysis.

Colored Hydrogel Microangiography

A microangiography was performed to map the portal branches before, immediately after, and 5 days after VPE using colored alginate hydrogels. Briefly, after intraperitoneal anesthesia, the inferior vena cava was cut, and the whole liver was perfused with 0.9% NaCl to completely remove the blood. Alginate red (AlgRed/CdS) was injected into the right cardiac ventricle to visualize the arteries, and alginate blue (AlgBlue/Ferric ferrocyanide) was injected into the portal vein to visualize the veins. Embolization was performed in 6 mice (group 1) with 8×10^6 microspheres of 10 μ m in diameter suspended in 0.3 mL 0.9% NaCl and mixed with 0.3 mL of 2% w/v AlgBlue in 0.9% NaCl. The hepatic artery was perfused with 1% AlgRed. In the control group of 6 mice (group 2), microspheres were omitted, and the liver was perfused with 0.6 mL 1% AlgBlue. The colored AlgRed and AlgBlue hydrogels were prepared, and the whole liver was fixed and processed as described previously.³²

Hepatocyte Isolation for Transplantation

Primary hepatocytes were isolated from control mice by collagenase perfusion of the whole liver. Briefly, the inferior vena cava was catheterized, the supra vena cava was clamped, and the portal vein was cut to facilitate the circulation of the

TABLE 1.

Results for each condition of VPE: Number and size (μm) of the microspheres injected, size of the needle (G), complications (death, necrosis, hemorrhage), percentage of microsphere lost in the injection tube, and the percentage of Ki67 staining

Six mice/group			Percentage of microspheres lost	Hemorrhage	Necrosis (%)	Death	Ki67 (%) at D2
Microspheres			Median (min-max)	No. (%)	Med (min-max)	No. (%)	Median (min-max)
Number	Size (μm)	Needle (G)					
10 ³	200	27	91 (89-96)	2 (33)	0	0	4 (3.2-4.3)
	100	27	61 (58-64)	2 (33)	0	0	0 (0-0.1)
		29	90 (81-92)	0	0	0	0 (0-0.1)
4 × 10 ³	100	27	90 (84-91)	2 (33)	0	0	1 (0-2)
10 ⁴	50	29	13 (10-16)	0	0	0	3 (2.3-3.2)
5 × 10 ⁴	50	27	44 (39-48)	2 (33)	0	0	4 (4-4.2)
		29	65 (60-65)	0	0	0	4 (3.9-4.1)
10 ⁵	30	27	5 (3-7)	2 (33)	10 (8-13)	0	3 (2-3.2)
		29	10 (0-12)	0	0	0	3 (2-3.4)
	50	27	70 (68-71)	2 (33)	0	0	4 (3.5-4.3)
3 × 10 ⁵		29	80 (78-83)	0	0	0	4 (3.9-4.1)
	30	27	6 (4-7)	2 (33)	11 (8-15)	0	4 (3.4-4.3)
		29	15 (14-17)	0	0	0	4 (3.9-4.1)
	50	27	85 (83-87)	2 (33)	0	1 (17)	4 (3.8-5)
6 × 10 ⁵		29	92 (90-95)	0	0	0	3 (2.9-3.5)
	30	27	19 (9-23)	3 (50)	22 (18-25)	2 (33)	5 (4.5-5)
		29	25 (22-27)	1 (17)	15 (13-18)	1 (17)	3 (2.7-4)
10 ⁶	30	29	71 (68-74)	0	0	0	1 (0.1-1.2)
4 × 10 ⁶	10	27	0	2 (33)	0	0	2 (1.2-2.2)
		29	0	0	0	0	2 (1-2)
	15	27	0	2 (33)	0	0	2 (1.3-3)
		29	0	0	0	0	2 (1.7-3)
	30	29	0	0	0	0	1 (0-1)
8 × 10 ⁶	10	27	0	2 (33)	0	0	5 (4-5.6)
		29	0 ^a	0	0	0	5 (4-5)
	15	27	0	2 (33)	0	0	4 (3.8-6)
		29	0	0	0	0	3 (2-3.2)
10 ⁷	10	29	0	0	51 (45-55)	0	5 (4.9-5.3)
12 × 10 ⁶	10	27	0	3 (50)	70 (66-74)	3 (50)	12 (11-15)
		29	0	2 (33)	72 (68-74)	0	11 (9-12)
	15	27	0	3 (50)	75 (69-78)	2 (33)	11 (9-15)
		29	0	2 (33)	70 (66-74)	0	10 (8-11)
14 × 10 ⁶	10	29	0	3 (50)	76 (73-78)	2 (33)	17 (15-20)
16 × 10 ⁶	10	27	0	4 (67)	82 (76-89)	3 (50)	20 (19-22)
		29	0 ^b	16 (53)	82 (76-89)	23 (77)	19 (18-21)
	15	27	0	4 (67)	82 (78-86)	4 (67)	26 (25-26)
		29	0	4 (67)	81 (78-85)	4 (67)	20 (19-21)
Hepatectomy 70%			0	1 (16.6)	0	0	19.5 (18-23)

^a49 min in this group.

^b30 min in this group.

infused liquid. After 2 successive washes with Hepes (2 mM KCl, 0.013 M fructose, 0.12 M NaCl, 2.8 mM Na_2HPO_4 , pH = 7.65), the liver parenchyma was digested by a Hepes- Ca^{2+} (Hepes supplemented with 10 mM CaCl_2) collagenase IV solution (Sigma, 0.8 mg/mL). The perfusion rate was fixed at 4 mL/min. The liver was then transferred in plating medium containing Roswell Park Memorial Institute 1640 medium, penicillin, streptomycin, and 10% fetal bovine serum (Hyclone Laboratories, Logan, UT) to obtain hepatocytes by mechanical dissociation with a scalpel and a nipper. After filtration through a 40- μm mesh filter and centrifugation (200g, 10 minutes), the viability of isolated cells was tested by Trypan blue dye exclusion and attachment of the

cells to tissue culture plastic in plating medium. Cells were transplanted only if viability was greater than 95%.

Hepatocyte Labeling

Hoechst Labeling

Freshly isolated hepatocytes were immediately labeled with Hoechst fluorescent dye in a serum-free plating medium (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Ham F12) containing 50 $\mu\text{g}/10^7$ cells in 1 mL of Hoechst. After 30 minutes of incubation at 37°C, the reaction was stopped by adding plating medium supplemented with 10% fetal bovine serum. Before transplantation, hepatocytes were washed 3 times in the plating medium and counted with a hemocytometer.

3,3',3''-tetramethylindotricarbocyanine iodide (XenoLight-DiR from PerkinElmer) Labeling

XenoLight-DiR is a lipophilic, near-infrared fluorescent cyanine dye that inserts into the cell membrane, resulting in specific and stable cell staining with negligible dye transfer between cells.³³

A total of 5×10^6 freshly isolated hepatocytes were immediately labeled with 320 $\mu\text{g/mL}$ XenoLight-DiR according to the manufacturer's protocol. Cells were incubated for 30 minutes at 37°C and spun down for 3 minutes at 1000 rpm at 4°C. Before transplantation, hepatocytes were washed 3 times in $1 \times$ phosphate-buffered saline (PBS) and counted with a hemocytometer.

Three mice were sacrificed at day 5 after different tests: mouse 1 received a transplant but was not embolized, control mouse was not embolized and did not receive a transplant, and mouse 3 was both embolized and transplanted with labeled cells.

On each mouse, cell tracking was performed both in vivo and post mortem in the lung, spleen, and liver using a 3CCD Digital Camera (PDE Photo Dynamic Eye C9830; Hamamatsu Photonics K.K., Japan).

Transplantation

Two groups of mice were compared. The first group underwent VPE in optimal conditions, whereas for the second group, only physiological saline was injected. Immediately after, both groups of mice were transplanted with 1 , 2 , or 4×10^6 labeled (XenoLight-DiR + Hoechst or only Hoechst) hepatocytes, from the same batch of cells, suspended in 100 μL of physiological saline. Hepatocytes were injected with a 29 G needle into the spleen. Moreover, the spleen injection corresponds to a safe and efficient site to transplant hepatocytes.³⁴⁻³⁶ We analyzed the percentage of marked cells (MARCEL) at day (D)5 in the liver parenchyma comparing the transplanted Hoechst-marked cell number (TRACEL) at day of surgery (D0) in 3 conditions of transplantation: 10^6 ($n = 7$), 2×10^6 ($n = 2$) or 4×10^6 ($n = 3$) cells.

Morphometric Analysis

Liver sections of 5- μm thickness were prepared from each of the liver lobes of all animals. The number of engrafted hepatocytes per unit of liver volume was determined as described previously.²⁰ The number of engrafted cells was evaluated under a microscope by counting Hoechst-labeled hepatocytes in 50 consecutive portal areas. The number of engrafted cells in clusters of various sizes was also documented. This analysis included single cells or those arranged in clusters of 2 to greater than 20 cells each. A minimum of 100 high-power fields ($\times 400$) of tissue from each animal were analyzed. After VPE as described above, DiR-labeled hepatocytes isolated from syngeneic mice, were transplanted through the spleen of C57BL6 mice. Control groups either received a transplant in parallel with the same batch of isolated hepatocytes without embolization or received only a saline injection in both the portal vein and spleen.

Tissue Analysis

Chemicals and reagents were purchased from Sigma unless otherwise specified. Liver samples were frozen in Tissue-Tek CRYO-OCT Compound (Miles Inc., Elkhart, IN) in cryomolds with liquid nitrogen, and 5- μm cryostat sections were prepared.

Tissue sections were counterstained with hematoxylin-eosin. Additional markers were detected by histochemical methods as described below.

Immunohistochemistry of The Regeneration Marker Ki-67

Five-micron liver tissue sections were fixed for 15 minutes in 3.7% formaldehyde. Endogenous peroxidase activity was blocked by incubating the tissue slices for 15 minutes in 3% hydrogen peroxide solution. Tissues were permeabilized with 2 successive 5-min baths of 0.025% Triton X-100. The samples were then incubated for 2 hours in 3% PBS/bovine serum albumin to prevent nonspecific immunostaining. Slides were incubated overnight with monoclonal anti-mouse Ki-67 (1:100; Abcam, Cambridge, MA) in $1 \times$ PBS. Staining was visualized with a Dako anti-rabbit antibody (1:500; MILLIPORE, Billerica, MA) followed by incubation with diaminobenzidine chromogenic substrate. The nuclei were counterstained with pure Mayer hematoxylin for 2 minutes. Immunohistochemistry was performed on liver from animals sacrificed 48 hours after hepatectomy and embolization, which corresponds to the peak of regeneration in C57BL6 mice.^{37,38} Ki67-positive nuclei were enumerated for each sample, at a magnification of $20\times$, 15 fields per section, 20 sections per hepatic lobe, cut each 50 microns. Blood vessels were excluded from the analysis. The percentage of proliferating hepatocytes was calculated by the ratio of Ki67-positive nuclei per total hematoxylin stained nuclei, excluding nuclei less than 12 μm in diameter.

Statistical Analysis

Categorical variables were described by frequencies and percentages. Their distribution was compared between 2 groups with the χ^2 or Fisher exact tests. Continuous variables were described by frequencies, median, and extremes. Their distribution was compared between 2 groups with the Student *t* test, and if necessary, the nonparametric Wilcoxon test. Correlations were studied with the Spearman coefficient.

Results were considered significant if *P* is less than 0.05. Data were analyzed with SAS 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC).

RESULTS

Defining Conditions of VPE

We wanted to define the parameters of volumetric partial embolization that induce liver regeneration without tissue damage. A total of 350 mice (age range, 4-8 weeks; weight, 20-30 g) were analyzed including 112 women and 238 men. The sex ratio was equivalent in the different experimental groups, except for the control group that underwent 70% partial hepatectomy, in which 50% were females.

The first parameter to determine was the infusion rate. We used 1×10^6 microspheres of 10 μm in diameter that were infused at a rate of either 20 $\mu\text{L/s}$ or 3.3 $\mu\text{L/s}$ (3 mice per group). An infusion rate of 20 $\mu\text{L/s}$ led to the segmental repartition of microspheres, whereas a rate of 3.3 $\mu\text{L/s}$ led to the distal and homogeneous distribution of microspheres, as determined by histological analysis, corresponding to volumetric repartition (not shown). All subsequent injections were thus performed at the low 3.3 $\mu\text{L/s}$ flow rate.

The second parameter to determine was the size and quantity of microspheres used. Many conditions were tested with

various sizes and numbers of microspheres on at least 6 mice for each condition.

Table 1 summarizes the different conditions used for VPE and the resulting outcomes, including the effect on liver regeneration measured by Ki67 index at D2 after the embolization.

We initially used a 29G needle (325 μ m diameter) to puncture the portal vein. However, many microspheres with a diameter greater than 30 μ m were lost in the manifold and syringe, which prevented precise control over the number of injected beads. Furthermore, microsphere loss increased in proportion with the number of microspheres injected. We subsequently tested 27G needles (400 μ m diameter). Injections resulted in hemorrhages in one third of mice because the mouse portal vein is very thin. Nonetheless, the bleeding could be stopped by simple compression and did not affect survival.

None of the 10- or 15- μ m diameter microspheres were lost in the infusion syringe, regardless of the quantity injected. These conditions resulted in the homogeneous distribution of the beads. The injection of 10×10^6 or greater of these microspheres resulted in hemorrhages that were associated with necrosis of 50% to 80% of the liver, eventually resulting in death (Table 1, Figure 1).

The optimal distribution of the microspheres in the mouse liver without negative outcomes was obtained with the injection of 4 to 10×10^6 , 10- to 15- μ m diameter microspheres through a 29G needle at an infusion rate of 3.3 μ L/s. Concerning induction of regeneration, we chose two third partial hepatectomy as control because that is the method of reference to trigger liver regeneration. In this group, we observed

a median of 19.5% (range, 18-23%) of Ki67-positive nuclei in the remaining liver (30%) without adverse effects (no complications or death), except for hemorrhage in 1 mouse.

Figure 2 represents the percentage of Ki67-positive cells at D2 after embolization, depending on either the size of the microspheres (upper panel) or the number of microspheres injected (lower panel). Regeneration appeared negatively correlated ($R = -0.58$; $P < 0.0001$) with the size of the microspheres and positively correlated with their number ($R = 0.74$; $P < 0.0001$).

Thus, combining microsphere distribution, adverse effects, and regenerative signal resulting from the VPE, the best condition was the injection of 8×10^6 , 10- μ m microspheres through a 29G needle at an infusion rate of 3.3 μ L/s, which gave rise to a median regenerative rate of 4.9% (4-5) of total liver with random distribution of Ki67-positive cells and no adverse effects. In the experiment to evaluate the hepatic effect of VPE for best condition for the long term, we realized blood samples and histological analysis at day 2 and day 21 to assess the good tolerance of the procedure for the embolized mice. We observed on liver tests an increase of ALT (5 times more than the control group) and AST (4 times more than the control group) and no significant differences for the other liver tests at day 2 after VPE compared with the control. At day 21, hepatic cytolysis persisted with lower rate for AST and ALT with 2 times more than the control group. Histologic analysis shows no differences without inflammation signs for the VPE mice except the presence of colored microspheres in the embolized liver. Of note, the 3 mice, which were kept alive until day 21 after VPE, did not exhibit any complication or abnormality.

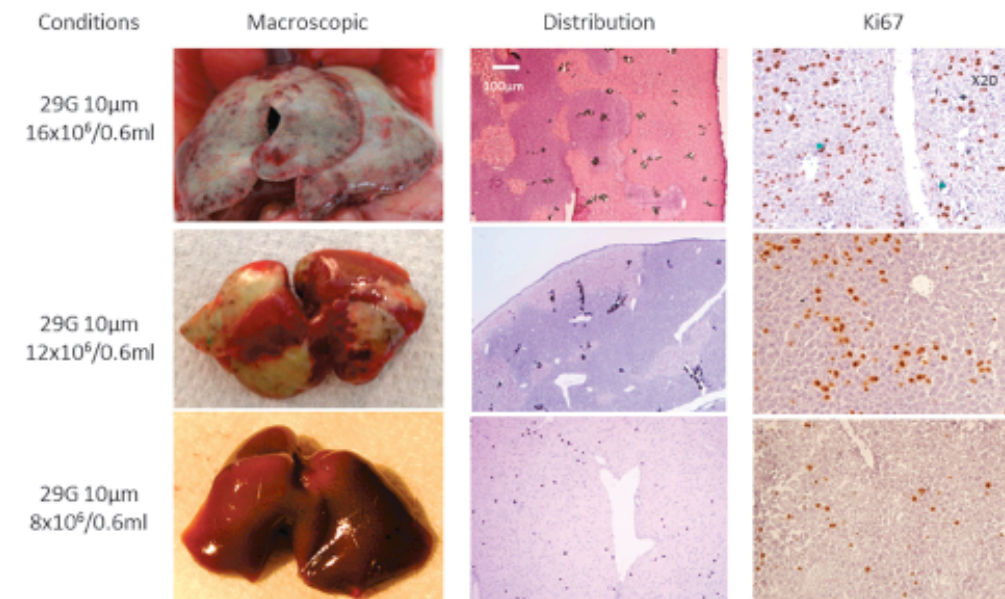


FIGURE 1. Histological and macroscopic analyses at D2 after VPE using 29G needle and 10- μ m microspheres. Three conditions are shown, corresponding to the injection of 8, 12, or 16×10^6 microspheres in 0.6 mL. Pictures in the columns show the macroscopic aspect of the liver (left), the distribution of the colored microspheres (middle), and the result of Ki67 immunolabeling in the liver parenchyma (right).

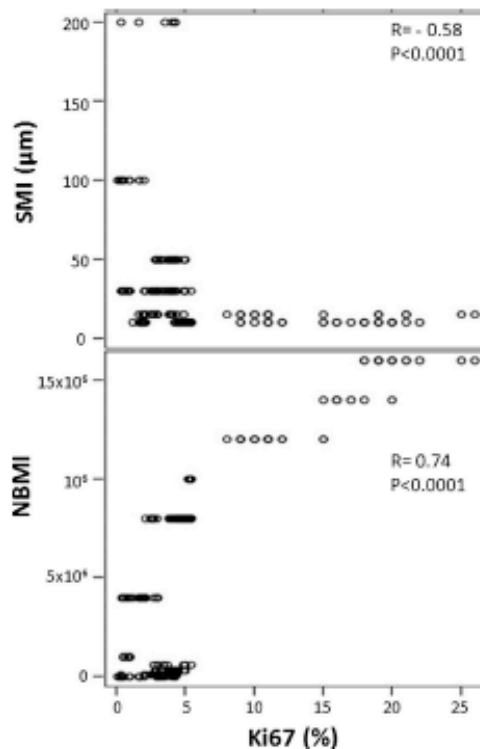


FIGURE 2 Results of Ki67 expression (liver regeneration) after VPE at D2. The graphs represent the percentage of Ki67⁺ cells in the liver parenchyma (%) depending on the size (SMI, upper panel) and number (NBMI, lower panel) of microspheres injected. Each point represents 1 mouse, and the correlation was analyzed with Spearman coefficients. NBMI indicates number of microspheres injected; SMI, size of the microspheres.

Angiography After VPE Using The Optimal Defined Conditions

To visualize and estimate the embolized territory, elicited by VPE, we analyzed the portal flow by colored alginate microangiography immediately (D0), and 5 days (D5) after VPE or physiological serum injection. In the liver after VPE by a mixture of 8 million of 10- μ m microspheres, at D0 after forward AlgBlue perfusion via the portal vein and AlgRed arterial cardiac perfusion, we show a global blockage of the venous flow with moderate venous dilatation, revealing the cleared, distally not perfused zone (Figure 3A). In the same conditions, control mice identified the robust venous and minor arterial vasculature, respectively, with all liver colorations (Figure 3B). This intralobular “fractal surface landscape” is designed by venous embolization starting where the distal portal vessel diameter decreased to $\leq 15 \mu$ m. Five days after VPE, the 2-color angiography revealed normalization of the main venous circulation supported by the portal vein (AlgBlue) and drained by the inferior vena cava (AlgRed). We observed a homogeneous diffusion in the control liver like D0 (Figure 4B), but less dense irrigation of AlgBlue in the whole liver parenchyma with a spotted aspect in group VPE

(Figure 4A), whereas the aspect of AlgRed (vena cava) in VPE group was more visible in embolized sites (Figure 4C).

This experiment thus confirmed the successful completion of VPE, with distal, partial, and random occlusions of presinusoidal portal veins.

Transplantation After Volumetric Embolization

Four mice were transplanted with double-labeled hepatocytes (XenoLight-DiR + Hoechst) isolated from syngeneic C57Bl6 mice, 2 mice in each group (VPE and control) to enable both *in vivo* and histological analyses. During this infusion, labeled cells were detected by the photo dynamic eye camera, first in the syringe, then in the spleen and finally reaching the liver 20 to 30 seconds later (Figure 5). *In vivo* fluorescence analysis at D5 revealed a strong fluorescence signal in mice embolized, whereas the fluorescence signal was barely visible for the transplanted but not embolized mice or absent in control mice (Figure 6A). We performed again fluorescence measurement post mortem on freshly isolated organs to obtain a better quality signal (Figure 6B). The fluorescence signal in the liver was stronger in mice embolized before transplantation than in those that were not embolized before transplantation. Spleens from recipient mice exhibited only a localized signal, which probably corresponded to the injection point. Fluorescence signal was not detected in the lungs of all mice and in the spleen of mice that did not receive transplanted hepatocytes.

Twenty-seven mice were transplanted with hepatocytes labeled using Hoechst only, 17 with VPE and 8 controls. No death or hemorrhage occurred during the procedures. Histological analysis of the liver at D5 allowed detection of clusters of Hoechst-labeled hepatocytes (Figure 7A) that have engrafted in the liver parenchyma. The median percentage and (range) of engraftment was 3% (2.5-3.2%) in the mice subjected to VPE in optimal conditions ($n = 14$), whereas it was only 0.65% (0.2-0.9%) in the control group ($n = 8$) that received an intraportal injection of hydroxyethylamidon (Figure 7B), and this difference is highly significant ($P < 0.0001$).

Interestingly, the percentage of MARCEL at D5 in the liver parenchyma compared with the TRACEL at D0 in the 3 conditions of transplantation show that increasing the TRACEL did not induce complications and led to an increase of MARCEL with positive correlation ($R = 0.67$; $P < 0.0001$) (Figure 7C).

DISCUSSION

Here, we aimed to develop a method for achieving the new concept of VPE. We reasoned that the random occlusion of part of small distal portal veins upstream from the sinusoid could trigger a regenerative signal and create physiological space for transplanted hepatocytes, as occurs in anatomical portal embolization. This “volumetric” portal embolization would induce the regenerative signal required for efficient hepatocyte engraftment while preserving the anatomy of proximal portal vessels and the volume of the whole organ for the engraftment of transplanted cells.

To achieve such a VPE, we chose to use calibrated inert polyester microspheres to limit inflammation in the tissue,³⁹ which could otherwise lead to engraftment failure.³ First, we had to determine the correct size of microspheres to obstruct presinusoidal vessels but not the proximal portal vein. Thus, we tested spheres ranging from 10 to 200 μ m in diameter, which correspond to variation in the diameter of

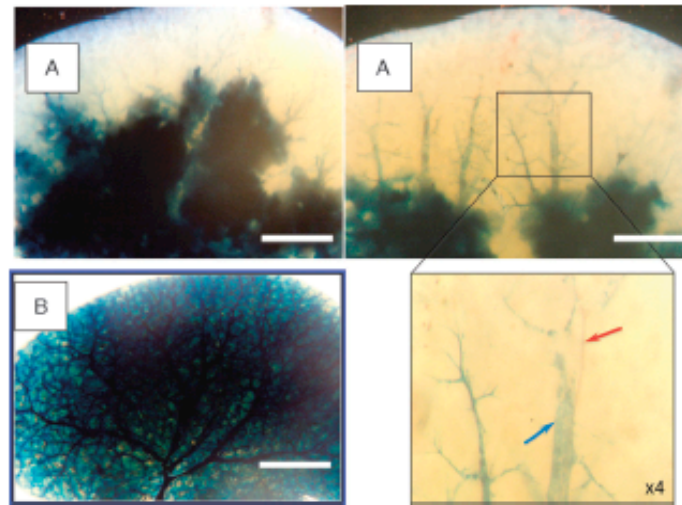


FIGURE 3. Colored alginate microangiography of control and regenerating liver after VPE at D0. All liver lobes were perfused with PBS, then with blue alginate hydrogel via the portal vein, and with red alginate hydrogel perfusion via the left ventricle to identify thinner arteries and arterioles. A, A VPE liver with 8 millions of 10-µm microspheres (DQ) reveals a net embolization of the centrilobular venous system, stop of the blue alginate leaving the distal zone of lobules empty. By a magnification of the VPE liver image, we can see the distal stop of the embolization and venous distention (blue arrow) colored in blue, without embolization of the arteriole (red arrow) colored in red by alginate. In comparison, panel B shows the fractal arborization of robust venous vasculature in a nonembolized liver control, without any stop at D0. Note, that image acquisition of colored alginate tracked blood vessels was taken after tissue-clearing the whole liver lobes. Scale bars represent 2 mm.

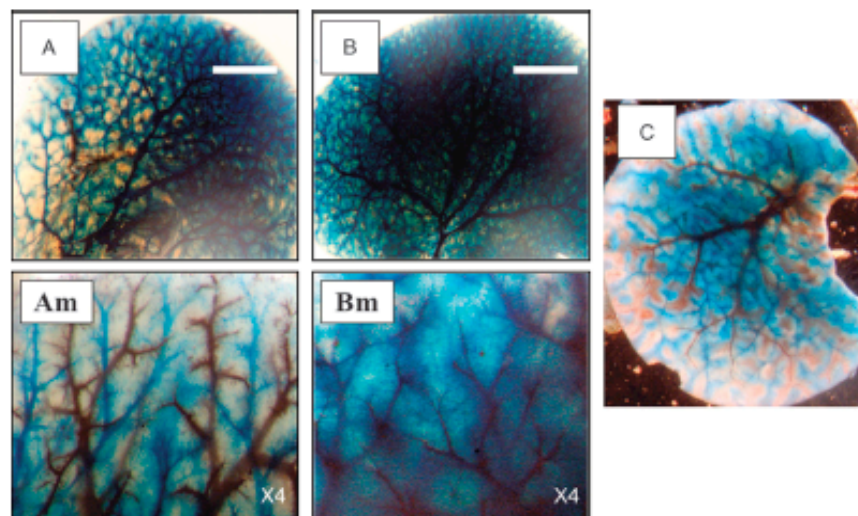


FIGURE 4. Colored alginate microangiography of control and regenerating liver following VPE at D5. Five days after portal injection (D5) of microspheres or physiologic serum injection, a 2-color angiography (blue alginate for portal vessels and red alginate for arterial and sub-hepatic vessels) were realized. This angiography reveals the persistence of distal, mainly avascular zone in VPE liver (A). For the control group (B), we show a higher density of blue alginate in the total liver. With magnification (Am, Bm) of the 2 pictures, we confirm those results, and it shows more precisely for VPE liver (Am) in blue the portal vessels and in dark red sub-hepatic vessels (Am). B, The perfect diffusion of blue alginate in portal vessels gives a blue color domination (B, Bm). C, We show a VPE liver segment at D5 where the release lobules (without blue alginate) from the embolization was colored in red due to efflux through the inferior vena cava as is highlighted. Note, that image acquisition of colored alginate tracked blood vessels was taken after tissue-clearing the whole liver lobes. Scale bars represent 2 mm.

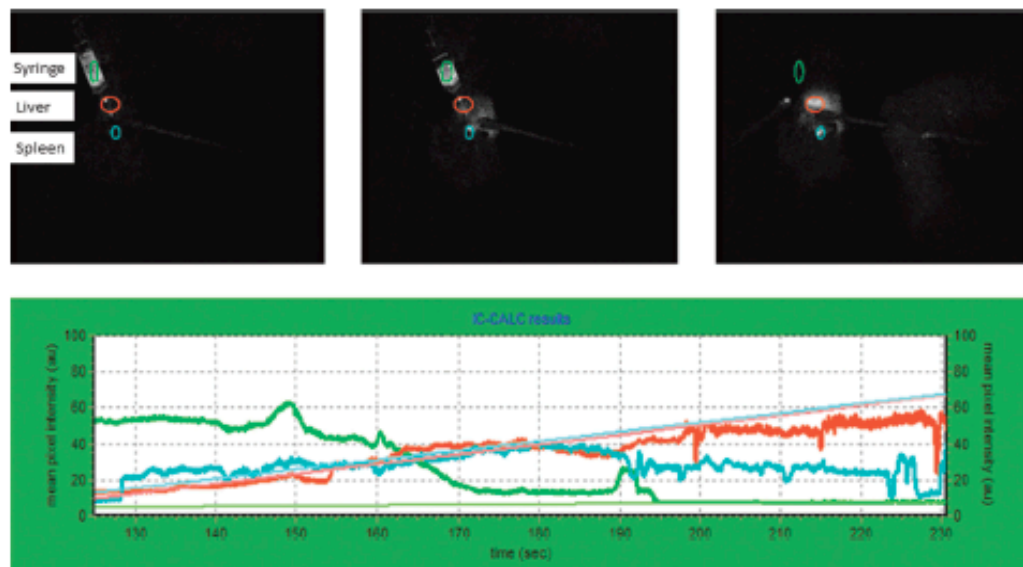


FIGURE 5. Quantification of XenoLight-DIR signal in vivo at D0 during the injection of labeled hepatocytes into the spleen for the engraftment of mouse liver after VPE. XenoLight-DIR signal was quantified with a photo dynamic eye (Hamamatsu Photonics K.K.) camera and VPE was performed in optimal conditions. Green, blue and red lines correspond to signals from cells in the syringe, the spleen and the liver, respectively.

presinusoidal hepatic vessels.^{40,41} The suspension volume was limited to 0.6 mL because the circulating blood volume of C57BL/6 adult mice is around 1.5 mL.^{10,42} Needles of 27G and 29G were used for portal injection to limit both the loss of microspheres in the needle or upstream in the catheter and the hemorrhagic risk due to the puncture of the thin mouse portal vein. We then verified the homogeneous repartition of the microspheres in total liver by histological and vascular analyses. We subsequently compared results of this new method of VPE for inducing liver regeneration with 70% hepatectomy, which is the gold standard method.^{24,27} The development of this new liver regeneration stimulation process required numerous animals for setting up the conditions, and the read out necessity for euthanasia. The mouse

model was thus the easiest and the most attainable to establish the proof of principle. Of course, given the limitations of the mouse model and based on the present results, we want to switch to a larger animal model, like pigs, for the future. It has been indeed shown in several animal models that the regeneration peak after hepatectomy or embolization was early.^{43,44} To demonstrate liver regeneration, we evidenced the expression of Ki67 antigen in the liver by immunohistochemistry technique because this cell proliferation marker has been extensively used to demonstrate that liver regeneration peak is at 48 hours in the mouse model.⁴⁵⁻⁴⁸ Ki67 labeling after VPE was both positively correlated with the number of microspheres used for embolization and negatively correlated with the diameter of the microspheres. However, this

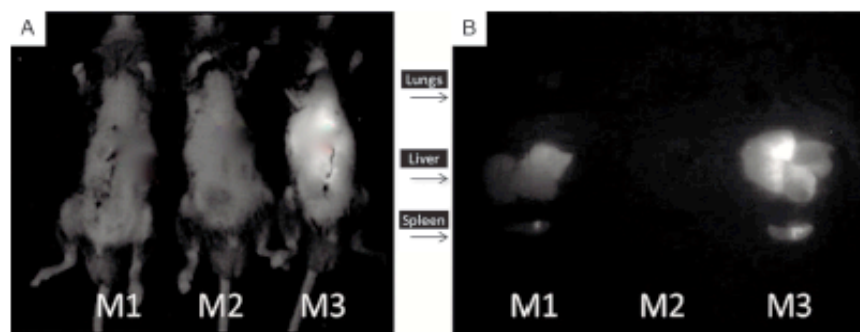


FIGURE 6. Quantification of XenoLight-DIR with a PDE camera at D5: mouse 1 (M1) received a transplant but was not embolized; control mouse (M2) was not embolized and did not receive a transplant; and mouse 3 (M3) was embolized and received a transplant. The in vivo analysis of whole animals was shown in panel A. The post-mortem analysis of the spleen, lung and liver of the same mice are shown in panel B. PDE indicates photo dynamic eye.

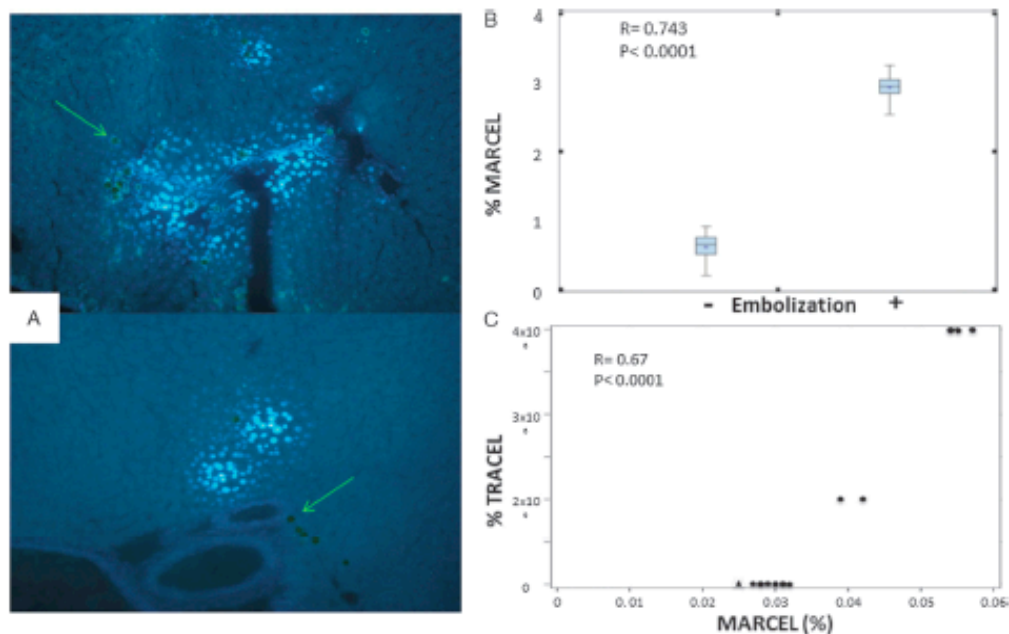


FIGURE 7. Analyses of labeled hepatocyte after transplantation. A, Clusters of Hoechst-labeled hepatocytes in the liver parenchyma near a portal space at D5 preceded by VPE in optimal conditions and splenic injection of 10^6 transplanted cells (TARCEL) at D0. B, Percentage of marked cells (MARCEL) found in the liver parenchyma at D5 with significant Spearman coefficient for: +: Mice subjected to VPE in optimal conditions. -: Nonembolized mice injected with physiological serum in the portal vein. C, Percentage of MARCEL found at D5 according to the number of TARCEL at D0 for embolized mice show positive correlation with Spearman coefficient.

finding requires confirmation in another animal model with larger portal vessels. Nonetheless, the diameter of sinusoid vessels is similar in C57Bl6 mice and humans.^{40,41} We identified macroscopic and histological liver necrosis at D2 in animals injected with the highest numbers of microspheres (10 to 16×10^6). The percentage of liver tissue undergoing necrosis was positively correlated with the quantity of $10\text{-}\mu\text{m}$ microspheres injected and reached 50% for $10^7/0.6\text{ mL}$ and 80% for $16 \times 10^6/0.6\text{ mL}$. Necrosis was associated with a high rate of mortality in embolized mice, which reached 70% for the highest quantity of microspheres (16×10^6). Death was probably caused by a major (>80%) obstruction of many sinusoid vessels, leading to acute liver failure.²⁷

The best conditions, which resulted in the regeneration of 5% of total liver, were 8×10^6 $10\text{-}\mu\text{m}$ microspheres infused with a 29G needle directly into the portal trunk at $3.3\text{ }\mu\text{L/s}$. Of note, the 3 mice which were kept alive until day 21 after VPE in the best conditions did not exhibit any complication or abnormality. The biologic cytotoxicity shown at day 2 and day 21 was moderate and directly due to the portal embolization because it was analyzed in clinical practice or animal models,^{49,50} and it decreased at D21 and did not have clinical or histological consequences in our experience. These conditions were used in all subsequent experiments.

Hepatocytes engraftment in the liver was analyzed 5 days after injection through the spleen. On the one hand, this delay is necessary because integration of hepatocytes in the liver parenchyma requires up to 5 days.³² On the other hand, we could not delay this analysis according to Hoechst because

cell marking decreases after D5 and becomes unreliable due to cell division and diffusion.^{51,52}

In these conditions, engraftment subsequent to VPE was 3 times more efficient than hepatocytes transplantation alone, demonstrating the interest of VPE in liver cell therapy approaches. We confirmed this improvement by *in vivo* and histological analyses with 2 fluorescent cell markers (XenoLight-DiR and Hoechst, respectively). Markers enabling the analysis of transplanted cells *in vivo* may be useful to assess further the quality of the transplantation.³³ The VPE preserves the total volume of the liver. This important factor is likely to improve cell engraftment because it enables more cells to be transplanted. Furthermore, this approach preserves the maximum number of hepatic vessels, which play an important role in normal liver regeneration^{42,53,54} and might decrease portal hypertension after cell transplantation.

Clinical trials have already demonstrated the safety of hepatocyte transplantation, and patients who have undergone hepatocyte transplantation showed the absence of adverse effects and some clinical improvement and/or partial correction of the underlying metabolic defect.^{38,54,57}

This therapeutic option will be available for patients with liver failure^{53,55} because our method of preparation avoids injuring or removing liver segments.

Finally, our results show that the preservation of proximal portal vessels and whole liver volume enables an increase in the number of transplanted cells, which increases the efficiency of engraftment. Thus, our approach constitutes an important step toward setting up a clinically applicable

technique for liver conditioning to improve the subsequent engraftment of transplanted hepatocytes.

In conclusion, this work demonstrates that VPE, a new minimally invasive technique, is an efficient method to prepare the liver for cell transplantation. However, preclinical studies on larger animals are needed to optimize this method and determine the best conditions for its clinical use.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Arnaud POUILLY (PULSION Medical Systems AG) for the loan of the camera and technical assistance. The authors also thank Nathalie BA (Institut Biomédical Bièvre IFR93) for technical assistance in the histological analyses.

REFERENCES

- Dhawan A, Mitry RR, Hughes RD. Hepatocyte transplantation for metabolic disorders: experience at King's College hospital and review of literature. *Acta Gastroenterol Belg.* 2005;68:457-460.
- Weber A, Mahieu-Caputo D, Hadchouel M, Franco D. Hepatocyte transplantation: studies in preclinical models. *J Inher Metab Dis.* 2006;29:436-441.
- Puppi J, Strom SC, Hughes RD, et al. Improving the techniques for human hepatocyte transplantation: report from a consensus meeting. In London. *Cell Transplant.* 2012;21:1-10.
- Gupta S, Chowdhury JR. Hepatocyte transplantation: back to the future. *Hepatology.* 1992;15:156-162.
- Gupta S, Gorte GR, Iranli AN. Hepatocyte transplantation: emerging insights into mechanisms of liver repopulation and their relevance to potential therapies. *J Hepatol.* 1999;30:162-170.
- Dhawan A, Mitry RR, Hughes RD, et al. Hepatocyte transplantation for inherited factor VIII deficiency. *Transplantation.* 2004;78:1812-1814.
- Dutkowski P, De Rougemont O, Mulhaupt B, Clavien PA. Current and future trends in liver transplantation in Europe. *Gastroenterology.* 2010;138:802-809.
- Fox LJ, Chowdhury JR, Kaufman SS, et al. Treatment of the Crigler-Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation. *N Engl J Med.* 1998;338:1422-1426.
- Sokol EM, Smets F, Bourgeois A, et al. Hepatocyte transplantation in a 4-year-old girl with peroxisomal biogenesis disease: technique, safety, and metabolic follow-up. *Transplantation.* 2003;76:735-738.
- Grossman HJ, Grossman VL, Bhattacharya PS. Hemodynamic characteristics of the intrahepatic portal vascular bed over an extended flow range: a study in the isolated perfused rat liver. *Hepatology.* 1995;21:162-168.
- Kamimura R, Ishii T, Sasaki N, et al. Comparative study of transplantation of hepatocytes at various differentiation stages into mice with lethal liver damage. *Cell Transplant.* 2012;21:2351-2362.
- Hansel MC, Gromgnol R, Sivovsk KJ, et al. The history and use of human hepatocytes for the treatment of liver diseases: the first 100 patients. *Curr Protoc Toxicol.* 2014;62:1-14.
- Bentzen D, Kumar V, Joseph B, et al. Hepatocyte transplantation activates hepatic stellate cells with beneficial modulation of cell engraftment in the rat. *Hepatology.* 2005;42:1072-1081.
- Enami Y, Bandi S, Kapoor S, et al. Hepatic stellate cells promote hepatocyte engraftment in rat liver after prostaglandin-endoperoxide synthase inhibition. *Gastroenterology.* 2009;136:2356-2364.
- Kim KS, Joseph B, Inada M, Gupta S. Regulation of hepatocyte engraftment and proliferation after cytotoxic drug-induced perturbation of the rat liver. *Transplantation.* 2005;80:653-659.
- Gagandeep S, Sokhi R, Behra S, et al. Hepatocyte transplantation improves survival in mice with liver toxicity induced by hepatic overexpression of Mad1 transcription factor. *Mol Ther.* 2000;1:358-365.
- Behra R, Kapoor S, Bandi S, et al. Directly acting drugs prostacyclin or nitroglycerine and endothelin receptor blocker bosentan improve cell engraftment in rodent liver. *Hepatology.* 2013;57:320-330.
- Fitzpatrick E, Mitry RR, Dhawan A. Human hepatocyte transplantation: state of the art. *J Intern Med.* 2009;266:339-357.
- Dagher I, Nguyen TH, Groyer-Picard M, et al. Efficient hepatocyte engraftment and long-term transgene expression after reversible portal embolization in nonhuman primates. *Hepatology.* 2009;49:950-959.
- Rajvanshi P, Kinn A, Bhargava KK, et al. Efficacy and safety of repeated hepatocyte transplantation for significant liver repopulation in rodents. *Gastroenterology.* 1996;111:1092-1102.
- Boudechiche L, Tranchesi H, Branchereau S, et al. Improvement of hepatocyte transplantation efficiency in the mdx-/- mouse model by glyoxyl trihydrate. *Transplantation.* 2014.
- Dutkowski P, Clavien PA. Solutions to shortage of liver grafts for transplantation. *Br J Surg.* 2014;101:739-741.
- Rickenbacher A, DeOliveira ML, Tian Y, et al. Arguments against toxic effects of chemotherapy on liver injury and regeneration in an experimental model of partial hepatectomy. *Liver Int.* 2011;31:313-321.
- Wan Z, Zhang XG, Liu ZW, Lv Y. Therapeutic liver repopulation for metabolic liver diseases: advances from bench to bedside. *Hepatol Res.* 2013;43:122-130.
- Dagher I, Boudechiche L, Branger J, et al. Efficient hepatocyte engraftment in a nonhuman primate model after partial portal vein embolization. *Transplantation.* 2006;82:1067-1073.
- Zweifel M, Brou K, Matczak K, et al. Restoration of hepatic mast cells and expression of a different mast cell protease phenotype in regenerating rat liver after 70% hepatectomy. *Immunol Cell Biol.* 2005;83:587-595.
- Lehmann K, Tschuor C, Rickenbacher A, et al. Liver failure after extended hepatectomy in mice is mediated by a p21-dependent barrier to liver regeneration. *Gastroenterology.* 2012;143:1609-1619.
- Michalopoulos GK. Liver regeneration after partial hepatectomy: critical analysis of mechanistic dilemmas. *Am J Pathol.* 2010;176:2-13.
- Morioka H, Hachiyu K, Matsuura H, et al. Sublobular veins as the main site of lymphocyte adhesion/transmigration and adhesion molecule expression in the porto-sinusoidal-hepatic venous system during concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Hepatology.* 2000;31:83-94.
- Okawa H, Masuda T, Sato S, et al. Changes in lymph vessels and portal veins in the portal tract of patients with idiopathic portal hypertension: a morphometric study. *Hepatology.* 1998;27:1607-1610.
- LaRue AC, Mironov VA, Argraves WS, et al. Patterning of embryonic blood vessels. *Dev Dyn.* 2003;228:21-29.
- Blazsek I, Clay D, Lederer P, et al. Purification and processing of blood-forming tissue units, the haematons, in searching for mammalian stem cell niches. In protocol exchange. *Nature.com/Nature.* 2013.
- Kalchauer V, Shih S, Molina V, et al. Use of lipophilic near-infrared dye in whole-body optical imaging of hematopoietic cell homing. *J Biomed Opt.* 2006;11:050507.
- Gabdelin G, Nussler AK, Morgott F, et al. Intrahepatic or subperitoneal hepatocyte transplantation to increase survival after surgically induced hepatic failure? *Eur Surg Res.* 2008;41:253-259.
- Puppi J, Dhawan A. Human hepatocyte transplantation overview. *Methods Mol Biol.* 2009;481:1-16.
- Gupta S, Yemini RR, Vemuru RP, et al. Studies on the safety of intrahepatic hepatocyte transplantation: relevance to ex vivo gene therapy and liver repopulation in acute hepatic failure. *Hum Gene Ther.* 1993;4:249-257.
- Heinrich S, Jochum W, Graf R, Clavien PA. Portal vein ligation and partial hepatectomy differentially influence growth of intrahepatic metastasis and liver regeneration in mice. *J Hepatol.* 2006;45:35-42.
- Kumil PC, O'Garra K, Wang X, et al. The effects of sorafenib on liver regeneration in a model of partial hepatectomy. *J Surg Res.* 2012;178:242-247.
- Van de Casteele M, Sagesser H, Zimmermann H, Reichen J. Characterisation of portal hypertension models by microspheres in anaesthetised rats: a comparison of liver flow. *Pharmacol Ther.* 2001;90:35-43.
- Hammad S, Hoshme S, Fitebi A, et al. Protocols for staining of bile canaliculi and sinusoidal networks of human, mouse and pig livers, three-dimensional reconstruction and quantification of tissue microarchitecture by image processing and analysis. *Arch Toxicol.* 2014;88:1161-1183.
- Wise E, Jacobs F, Topal B, et al. The size of endothelial fenestrae in human liver sinusoids: implications for hepatocyte-directed gene transfer. *Gene Ther.* 2008;15:1193-1199.
- Melito Y, Naqvi S, Schumann N, et al. Fate tracing of mature hepatocytes in mouse liver homeostasis and regeneration. *J Clin Invest.* 2011;121:4850-4860.
- Furer K, Tian Y, Pfammatter T, et al. Selective portal vein embolization and ligation trigger different regenerative responses in the rat liver. *Hepatology.* 2008;47:1615-1623.
- Verhaule E, Ren YD, Van Huse J, et al. Expression of placental growth factor in regenerating livers after partial hepatectomy in the rat. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2011;23:66-75.
- Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. Liver regeneration. *Hepatology.* 2006;43:S45-S53.

46. Shimizu T, Togo S, Kumamoto T, et al. Gene expression during liver regeneration after partial hepatectomy in mice lacking type 1 tumor necrosis factor receptor. *J Surg Res.* 2009;152:179–188.
47. Su AL, Guidotti LG, Paracki JR, et al. Gene expression during the priming phase of liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:11181–11186.
48. Yuan Y, Wu X, Ou Q, et al. Differential expression of the genes involved in amino acids and nitrogen metabolisms during liver regeneration of mice. *Hepatol Res.* 2009;39:301–312.
49. Farges O, Belghiti J, Kianmanesh R, et al. Portal vein embolization before right hepatectomy: prospective clinical trial. *Ann Surg.* 2003;237:208–217.
50. Hulsmans F, van Londen KP, Damude S, et al. A review of animal models for portal vein embolization. *J Surg Res.* 2014;191:179–188.
51. Uchida N, Fujisaki T, Eaves AC, Eaves CJ. Transplantable hematopoietic stem cells in human fetal liver have a CD34(+) side population (SP) phenotype. *J Clin Invest.* 2001;108:1071–1077.
52. Hightower MJ, Fairfield FR, Lucas JJ. A staining procedure for identifying viable cell hybrids constructed by somatic cell fusion, cybridization, or nuclear transplantation. *Somatic Cell Genet.* 1981;7:321–329.
53. Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. Liver regeneration. *J Hepatol.* 2012;57:692–694.
54. Ding BS, Nolan DJ, Butler JM, et al. Inductive angiocrine signals from sinusoidal endothelium are required for liver regeneration. *Nature.* 2010;468:310–315.
55. Clavien PA, Petrowsky H, DeOliveira ML, Graf R. Strategies for safer liver surgery and partial liver transplantation. *N Engl J Med.* 2007;356:1545–1559.

Conclusion 1

Nous avons ainsi montré que chez la souris :

- 1- Il est possible de réaliser une embolisation portale distale, pré-sinusoidale et sinusoidale, par injection lente, dans la veine porte, de 8 millions de microsphères de 10 µm de diamètre diluées dans une solution dense de Voluven®, sans provoquer d'ischémie ou de souffrance hépatique. La faisabilité du concept d'embolisation portale volumétrique est donc validée.
- 2- Cette EVP a permis de créer un signal de régénération hépatique de 5% dans le foie entier sans diminuer le volume parenchymateux disponible pour l'intégration des cellules transplantées.
- 3- Cette nouvelle technique d'embolisation favorise la prise de greffe à 5 jours après la transplantation d'hépatocytes avec un facteur 3 par rapport à une injection portale simple dans le cadre de greffes syngénique.
- 4- Elle permettrait d'augmenter le nombre d'hépatocytes injectable sans thrombose portale mais ces résultats sont à confirmer
- 5- Le DIR semble intéressant et permet une imagerie *in vivo* à J0 et J5 avec possible suivi à plus long terme et une bonne correspondance quantitative et qualitative par rapport à l'histologie.

4.2. Evaluation du potentiel de différenciation hépatique des MSC fœtales humaines

4.2.1. Présentation de l'article 2 et 3

La thérapie cellulaire par transplantation d'hépatocytes pourrait devenir la technique de référence en remplacement de la greffe orthotopique du foie pour le traitement de certaines maladies hépatiques. Cependant, les hépatocytes sont peu disponibles en raison de la pénurie grandissante de don d'organe. Par ailleurs leur manipulation reste délicate du fait de leur fragilité en culture *in vitro* et de leur sensibilité aux phases de congélation/décongélation liées à la cryoconservation. Face à ces restrictions, il semble donc nécessaire d'explorer des sources plus fiables d'hépatocytes à transplanter. Ainsi, les cellules souches somatiques sont des candidates potentielles pour le développement de la thérapie cellulaire du foie et plus précisément les cellules souches mésenchymateuses (MSC) qui possèdent une faible immunogénicité [319] et une faible propension quant à la formation de tumeurs [442]. Notre laboratoire est parvenu à isoler puis caractériser une population de MSC du foie fœtal humain (11-12 semaines de gestation) [321]. Ces FL-CSM sont multipotentes et expriment des marqueurs mésenchymateux de même que certains facteurs de transcription hépatiques. Il nous a semblé intéressant d'évaluer leur capacité de différenciation en hépatocytes fonctionnels *in vitro*, ainsi que leur capacité de prise de greffe et de différenciation *in situ* après transplantation à des souris immunodéficientes. Nous avons pour cette partie transplantée des FL-CSM, différenciées ou non, en intra-hépatique dans des souris NOD/SCID âgées de 2 jours. Nous avons choisi les souris NOD/SCID car elles sont déficientes en cellules immunitaires B et T et NK fonctionnelles d'une part, et présentent une fonction défective des cellules présentatrices d'antigène et une absence de complément circulant ce qui diminue les risques de rejet des cellules humaines transplantées, d'autre part. Etant donné que les FL-CSM différenciées générées expriment notamment des marqueurs hépatoblastiques, nous avons trouvé logique de les transplanter dans un foie en cours de développement à un stade proche. Le foie des souris nouveau-nées continue son développement (prolifération et maturation) en présence de

plusieurs facteurs de croissance sécrétés par les divers types cellulaires qui le constituent, ce qui favoriserait l'intégration au parenchyme et la maturation des cellules transplantées. Les cellules ont été injectées dans le foie à travers la peau transparente. Ce procédé peut être à l'origine d'une perte au niveau du volume injecté avec passage des cellules soit dans le péritoine soit ailleurs. Cette variabilité peut influencer les résultats visant à comparer les souris d'un même groupe ou des deux groupes (indiff vs diff). De ce fait, nous nous sommes plus intéressés à mettre en évidence la présence des cellules humaines dans les foies de souris et à évaluer leur degré de différenciation *in situ* qu'à tenter une estimation comparative du pourcentage de repeuplement du foie par les cellules injectées.

Les résultats obtenus font l'objet d'un article présenté dans le paragraphe suivant.

4.2.2. Article 2 : Stem Cell Research and Therapy (accepté 2014)

A population of Human Mesenchymal Stem cell Specific to the Fœtal Liver Development

Wenwei Zhang, Zahia Hamidouche, Guillaume Pourcher, Varvara Gribova, Farhad Haghighi, Jean-Jacques Candelier, Pierre Charbord and Anne Dubart-Kupperschmitt

ABSTRACT

Mesenchymal Stem Cells (MSCs) with osteoblastic/chondrocytic potential have been detected in different anatomical sites including the fetal liver (FL). The puzzling presence of such cells in FL led us to investigate whether they displayed additional differentiation competence compatible with their location at this developmental stage. This study has resulted in the successful isolation of a population of clonogenic cells from 11-12 gestational week human fetal livers that spontaneously differentiated into vascular smooth muscle cells during the proliferative phase. The cells were also able to differentiate into adipocytes, osteoblasts and chondrocytes, but only when submitted to specific culture conditions. Moreover, the isolated population expressed hepatocytic transcription factors. The analysis of FL sections suggested that the clones generated in culture were derived from a subset of Nestin, vimentin and alphaSM actin pericytes. The FL specification of the MSCs described here is in agreement with the known plasticity of the mesenchyme.

Keywords : Differentiation, vasculature, bone, cartilage, fat, pericyte, stromal cell, hepatocyte, transcription factor.



Research Article

Open Access

A Population of Human Mesenchymal Stem Cells Specific to the Fetal Liver Development

Wenwei Zhang^{1,2}, Zahia Hamidouche^{1,2}, Guillaume Pourcher^{1,2}, Varvara Gribova^{1,2}, Farhad Haghighi^{1,2}, Jean-Jacques Candelier^{1,2}, Pierre Charbord^{1,2} and Anne Dubart-Kupperschmitt^{1,2*}

¹INSERM UMR_S972, Paul Brousse Hospital, Villejuif, F-94807, France

²Université Paris-Sud, UMR_S972, Paul Brousse Hospital, Villejuif, F-94807, France

³DHU Hepathov, Paul Brousse Hospital, Villejuif, F-94807, France

Abstract

Mesenchymal Stem Cells (MSCs) with osteoblastic/chondrocytic potential have been detected in different anatomical sites including the Fetal Liver (FL). The puzzling presence of such cells in FL led us to investigate whether they displayed additional differentiation competence compatible with their location at this developmental stage. This study has resulted in the successful isolation of a population of clonogenic cells from 11-12 gestational week human fetal livers that spontaneously differentiated into vascular smooth muscle cells during the proliferative phase. The cells were also able to differentiate into adipocytes, osteoblasts and chondrocytes, but only when submitted to specific culture conditions. Moreover, the isolated population expressed hepatocytic transcription factors. The analysis of FL sections suggested that the clones generated in culture were derived from a subset of nestin⁺, vimentin⁺ and alpha-SM actin⁺ pericytes. The FL specification of the MSCs described here is in agreement with the known plasticity of the mesenchyme.

Keywords: Differentiation; Vasculature; Bone; Cartilage; Fat; Pericyte; Stromal cell; Hepatocyte; Transcription factor

Introduction

Mesenchymal Stem Cells (MSCs) are clonogenic cells capable of considerable expansion in culture and, under specific conditions, able to differentiate into the mesenchymal lineages, i.e. osteoblasts, adipocytes and chondrocytes [1]. Because of their mesenchymal differentiation potential and their capacity to express and secrete a number of trophic agents, anti-inflammatory and anti-apoptotic molecules [2,3], this stem cell type has attracted considerable attention and MSCs are presently used in many cell therapy protocols for the treatment of osteo-articular, cardio-vascular and immune diseases [4-7].

MSCs have been isolated firstly from Bone Marrow (BM) aspirates [8,9] and BM remains a major source in many human therapy protocols [10,11]. This location is in agreement with the mesenchymal differentiation potential and the capacity of these cells to regenerate bone and cartilage after injury and in case of bone genetic disease [12]. The BM primary localisation of MSCs is also fitting with another major property of these cells, i.e. their capacity to provide stromal cells serving as niches for Hematopoietic Stem Cells (HSCs) by synthesizing factors (cytokines, morphogens, adhesion molecules) essential for HSC self-renewal and commitment into the hematopoietic lineages [13-18]. Due to this niche formation, it is also expected to find MSCs in the other developmental sites of definitive hematopoiesis, such as the fetal liver and aorta-gonads-mesonephros region, and indeed several reports have described cells with mesenchymal differentiation potential and stromal capacity in such sites [19-22]. However, MSCs have also been found in many other tissues unrelated to hematopoiesis, such as adipose tissue, adult liver or pancreas [21,23-25]. This wide distribution has suggested that MSCs are associated to an organismal system and indeed many reports have suggested that MSCs may derive from a population of vascular pericyte-like cells [20,21,26]. While this still debated hypothesis may account for the cell distribution, it does not fit with the differentiation potential of the cells, i.e. their capacity to give rise to bone or cartilage in tissues totally devoid of these derivatives, such as the fetal or adult liver.

The purpose of the present study has been to investigate the differentiation potential of MSCs derived from human fetal liver with the underlying assumption that their potential would include non-mesenchymal pathways in agreement with the location of the cells in this site and at this stage. This study has identified clonogenic cells, from 11-12 gestational week (GW) human fetal liver (FL), whose phenotype and differentiation potential are similar to those of BM MSCs. However, we have also demonstrated that these cells differ from bone marrow MSCs by a number of unique features. These differences include their capacity to differentiate into vascular smooth muscle cells (VSMC) during the proliferative phase without addition of specific VSMC inducers, their enhanced proliferation and clonogenic capacity and the expression of specific skeletal muscle and hepatic transcription factors. Anatomical-histological studies suggest that these clonogenic cells are derived from rare nestin⁺/alpha-SM-actin⁺/vimentin⁺ vascular cells located in the wall of non-portal vessels. Taken together, our data shows that this cell population represents MSCs specific to the fetal liver development.

Material and Methods

Fetal liver specimens

Human fetal livers at GW 11 or 12 were collected and carefully dissected from fetuses after voluntary pregnancy termination with the mothers consent, abiding by the ethical French guidelines.

*Corresponding author: Anne Dubart-Kupperschmitt, INSERM UMR_S972, Paul Brousse Hospital, Villejuif, F-94807, France, Tel: 33145595138; Fax: 33147260319; E-mail: anne.dubart@inserm.fr

Received July 31, 2014; Accepted October 20, 2014; Published October 22, 2014

Citation: Zhang W, Hamidouche Z, Pourcher G, Gribova V, Haghighi F, et al. (2014) A Population of Human Mesenchymal Stem Cells Specific to the Fetal Liver Development. J Stem Cell Res Ther 4: 238. doi:10.4172/2157-7633.1000238

Copyright: © 2014 Zhang W, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Cell isolation and culture

Fetal livers were aseptically cut into small pieces and were digested for 1 hour at 37°C under gentle stirring in a mixture of collagenases I, III, IV (Sigma C-1639, C-1764, C-1889 respectively, 10 mg/mL each) and hyaluronidase 10 mg/mL (Sigma H-3757) in 6 mL IMDM with 20% FCS and 1 mM HEPES pH 7.65. The harvested cell suspension was filtered through a 70 µm cell strainer then seeded in plating medium (Williams' Medium E/DMEM-F12 (1:1) with 10% FCS (Hyclone) and 0.1% (w/v) BSA). After 24 hour, the plating medium was replaced by complete medium consisting of a MEM medium with 10% FCS (Hyclone) and 1 ng/mL fibroblast growth factor (FGF)-2 (R&D). The medium was changed every 3-5 days until adherent cells reached confluence. At the first passage, to evaluate the cloning efficiency, cells were seeded by FACS at 1, 2, 5, 10 and 15 cell(s) per well in 96-well plates, not selecting for specific membrane expression. Cells were cultured with complete medium at 37°C, 5% CO₂. The medium was changed every 3-5 days and each clone was individually amplified when cells from wells that were seeded with 1 cell reached confluence.

Statistical data

Results are given as mean ± standard error (m ± sem). Significance of the difference between groups was evaluated by analysis of variance (ANOVA), followed by a 2-tailed Student t test.

Cell differentiation, flow cytometry, Q-RT-PCR, immunofluorescence stainings and Western blotting procedures were performed as previously indicated [27,28]. Details are provided in the supplementary material.

Results

Generation of human FL fibroblastoid clones

As described in the methods, 22 clones were generated from 11-12 GW human fetal livers from cells that have been selected on their adherence and expansion capacity. The cloning efficiency was 1-4 per 10 seeded cells (Figure 1A, left panel). While some clones developed slowly, showing growth arrest after 15-20 population doublings (PD), faster growing clones propagated for more than 25 PD, their division time being approximately 24 hour (Figure 1A, right panel). By day 5, the cells appeared elongated (Figure 1D, upper panel); by day 14, in confluent cultures, the cells were densely packed but retained contact growth-inhibition (Figure 1D, lower panel). Flow cytometry was used to analyze the expression of cell surface markers of cells from each clone. The results detected the expression of the mesenchymal markers CD73, CD90, CD105, CD146; however there was no expression of the hemato/endothelial markers CD31, CD34 and CD45 (Figure 1B, upper panel). The comparison of the membrane phenotype of the clonal cells with cells from primary layers indicated that some cells from primary layers still expressed CD45 and that the expression of CD90 in these primary layers was heterogeneous (Figure 1B, lower panel). The plot of relative Mean Fluorescence Intensity versus the percentage of positive cells clearly exhibits inter-clonal heterogeneity for CD73, CD90 and CD105 (Figure 1C). The heterogeneity of expression of CD146 was observed for both the clonal cells and the cells from primary layers.

Human FL fibroblastoid clones differentiate into adipocytes (A), osteoblasts (O) and chondrocytes (C) in the presence of specific inducers

To determine whether the clonogenic cells that generated the clonal cells were similar to MSCs, we studied the A, O, and C differentiation potential of three healthy well-growing clones generated at passage 1.

We observed the progressive appearance of Oil red-positive vesicles in clonal cells cultured in adipogenic medium; by day 30 the majority of cells contained these vesicles, which, even at this late stage of culture, remained small-sized (less than 1 µm in diameter) (Figure 2Aa, lower panel). Moreover, Q-RT-PCR results indicated the progressive increase of *PPARG* expression throughout the culture period, while a transitory increase in *CEBPA* expression was observed at day 4 (Figure 2Ab). Western blotting revealed a significant ($p < 0.01$) increase in the expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (*PPARG*) and fatty acid-binding protein (*FABP4*) at day 4 and at day 10, respectively (Figure 2Ac). In clones grown in osteogenic medium, there was an increase in alkaline phosphatase⁺ cells by day 7, and large areas of mineralization (demonstrated using von Kossa's and alizarin red stains) were apparent by day 21 (Figure 2Ba). We observed through immunostaining, before osteogenic induction, that most cells expressed the runt-related transcription factor 2 protein (*RUNX2*), the distribution of which was both cytoplasmic and nuclear (Figure 2Bb, left panel). However, 4 days after osteogenic induction, the expression was exclusively nuclear (Figure 2Bb, right panel). Moreover, Q-RT-PCR studies indicated a slight but significant ($p < 0.05$) increase in *RUNX2* at day 4 (Figure 2Bc). Under chondrogenic conditions, clonal cells developed large aggregates over 3 weeks in culture. By day 21 these aggregates were aggrecan⁺, safranin O⁺, alcian blue⁺ (Figure 2Ca) and collagen II⁺ (Figure 2Cb, right panels). Moreover, immunostaining displayed a similar pattern of SOX-9 expression when compared to *RUNX2* (Figure 2Cb, left panels).

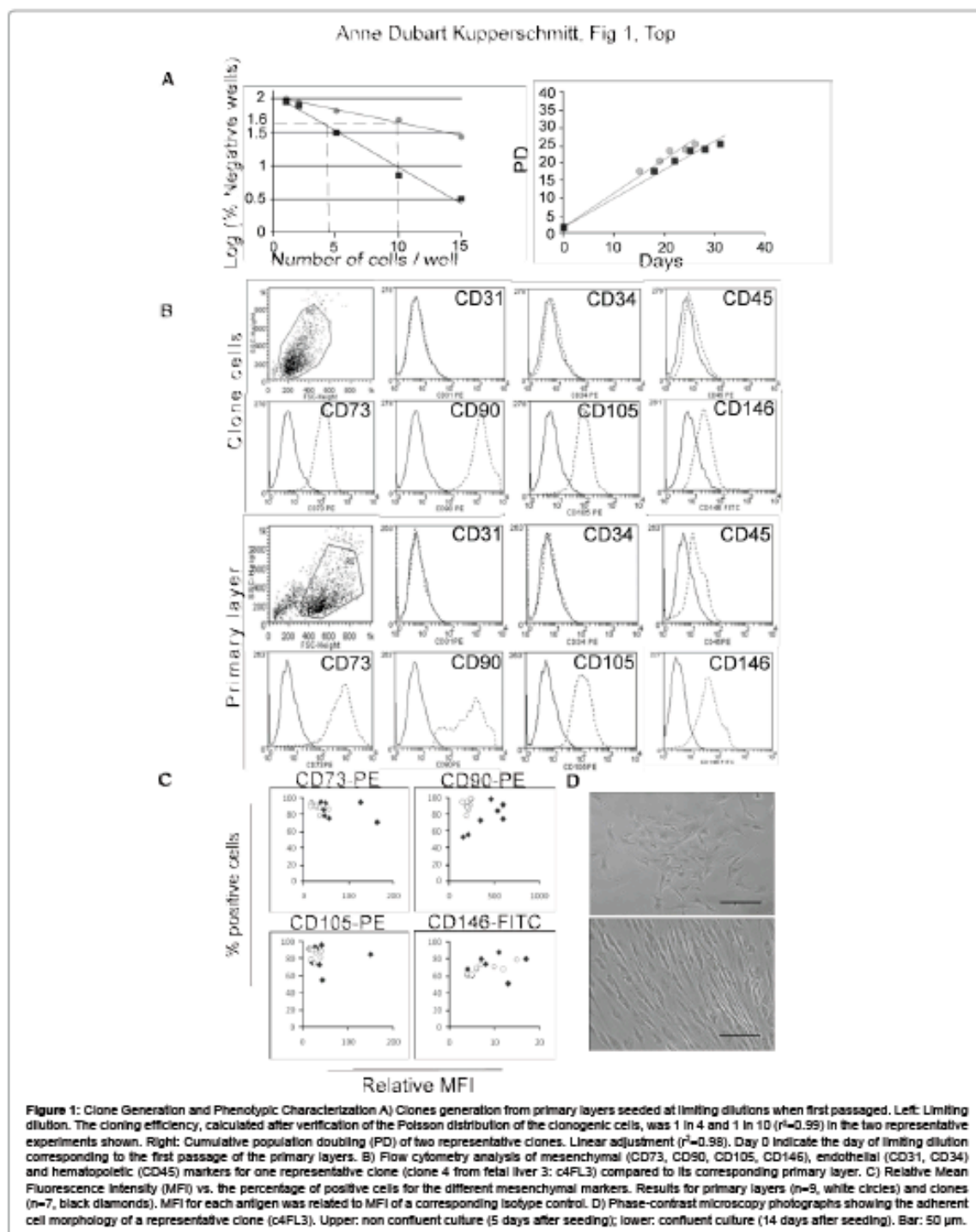
Human FL MSC clones grown in proliferation medium differentiate into myogenic cells

We observed through immunostaining that most clonal cells grown in proliferation medium expressed the mesenchymal cytoskeletal markers vimentin and nestin, the vascular smooth muscle cell (VSMC) cytoskeletal marker α -smooth muscle (-SM) actin and the myogenic cytoskeletal markers desmin, calponin and α -sarcomeric (-SK) actin (Figures 3A and B). The expression of the VSMC cytoskeletal marker SM-myosin was more discrete (Figures 3A and B). Analysis of protein expression by WB indicated the presence of specific bands for SM-myosin, heavy chain caldesmon, calponin, α -SK actin, desmin, α -SM actin, nestin and vimentin and for the myogenic transcription factor myocardin (Figure 3C). Furthermore, the analysis of a number of transcripts affiliated to the skeletal muscle pathway revealed that *PAX3* was expressed at levels similar to that of human cultured myoblasts; while *MYOD1* expression was also detected at levels 100 times lower than that observed in myoblasts (Figure 3D). These results indicate that the isolated cell population has myogenic differentiation potential.

Human FL MSC clones do not express markers of non-mesenchymal mesoderm nor of pluripotent stem cells

As the FL clonogenic cells exhibited a greater differentiation potential when compared to BM MSCs, we investigated the expression of specific markers characteristic of non-mesenchymal mesodermal blood-forming and endothelial cells. As previously indicated, hemato-endothelial cell membrane markers such as CD31 and CD34 were not detected, nor was von Willebrand factor known to be expressed in a granules of endothelial cells and megakaryocytes (not shown). Moreover, hematopoiesis-affiliated transcription factors were not detected, except for *RUNX1* (Supplementary Figure 1A).

The expression of the classical markers of pluripotent stem cells was also studied. FACS analysis indicated that MSC clonal cells did not express the pluripotent stem cell marker TRA-1-81 and minimally



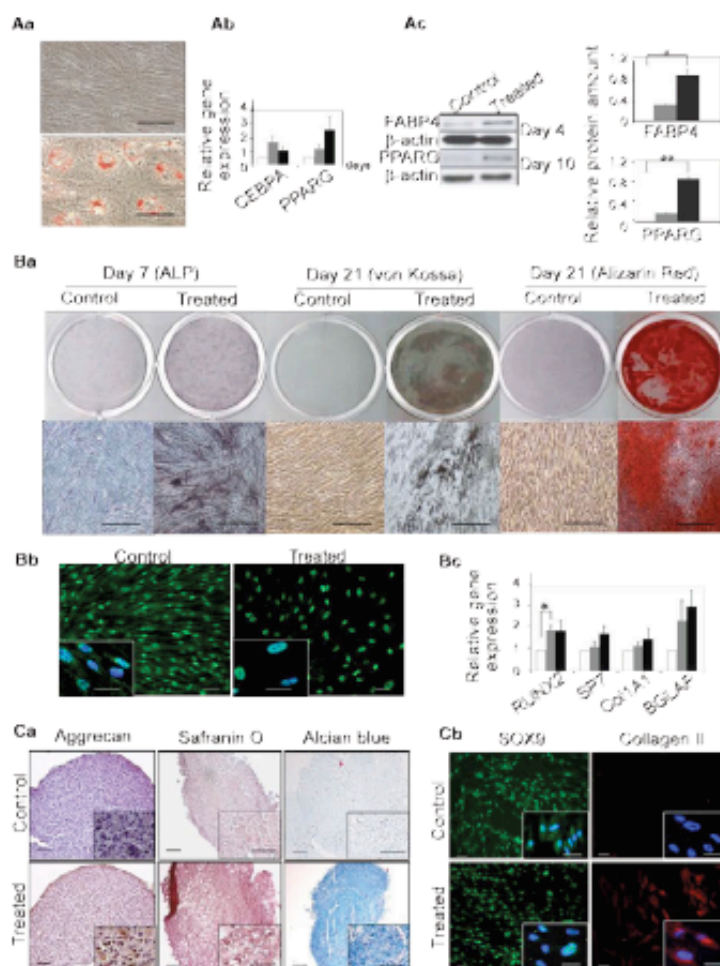


Figure 2: Mesenchymal Differentiation of Clones

A) Adipogenic

a) Morphology of c4FL3 cells stained by Oil Red. Upper: Control culture (untreated) grown in expansion medium for 30 days. Lower: Cells cultured in adipogenic conditions (treated) for 30 days; Bar: 20µm

b) Q-RT-PCR data showing the expression of *PPARG* and *CEBPA* in 3 clones (c4FL3, c3FL8, c7FL8) at day 4 and day 21 after the induction of differentiation. Values are expressed as mean \pm SEM of gene expression normalized to that of *GAPDH* and related to that at day 0 ($\Delta\Delta Ct$ method). White bars: day 0; gray bars: day 4; black bars: day 21. Values at different time-points are not significantly different.

c) Western blot analysis of fatty acid-binding protein 4 (FABP4) and peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) protein levels in clones at day 4 and day 10 after adipogenic induction, respectively. Left: representative western blot (c4FL3). Right: densitometric studies. Mean \pm SEM of values obtained for clones c4FL3, c3FL8 and c7FL8. Value for each protein was related to that of β -actin. Gray bars: protein extracts of non-treated cells; black bars: protein extracts of cells 4 or 10 days after adipogenic induction. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

B) Osteoblastic

a) Histology for clone c4FL3. Left: alkaline phosphatase (ALP) staining showing the initiation of osteoblastic differentiation at day 7 after induction. Centre and Right: mineralization assessed by von Kossa and alizarin stains at day 21. Bars: 50µm.

b) Immunofluorescence using antibodies against transcription factor RUNX2 for clone c4FL3 in non-induced (untreated) cells or at day 4 after induction of osteoblastic differentiation (treated). Bars: 10µm.

c) Q-RT-PCR data showing expression of *RUNX2*, *SP7*, *Col1A1* and *BGLAP* in 3 clones (c4FL3, c3FL8 and c7FL8) at day 4 and day 14 after differentiation induction. Values are expressed as mean \pm SEM of gene expression normalized to that of *GAPDH* and related to that at day 0 ($\Delta\Delta Ct$ method). White bars: day 0; gray bars: day 4; black bars: day 14. * $p < 0.05$.

C) Chondrocytic

a) Aggrecan, safranin O and alcian blue stainings for clone c4FL3 at day 21 in absence of induction (untreated) or after differentiation induction (treated). For each staining, a magnification view is shown in insert. Bars: 25 µm.

b) Immunofluorescence for transcription factor SOX9 and for collagen II in the representative clone (c4FL3) in absence of induction (untreated) or at day 7 after differentiation induction (treated). Bars: 10 µm.

Anne Dubart Kupperschmitt, Fig 3, Top

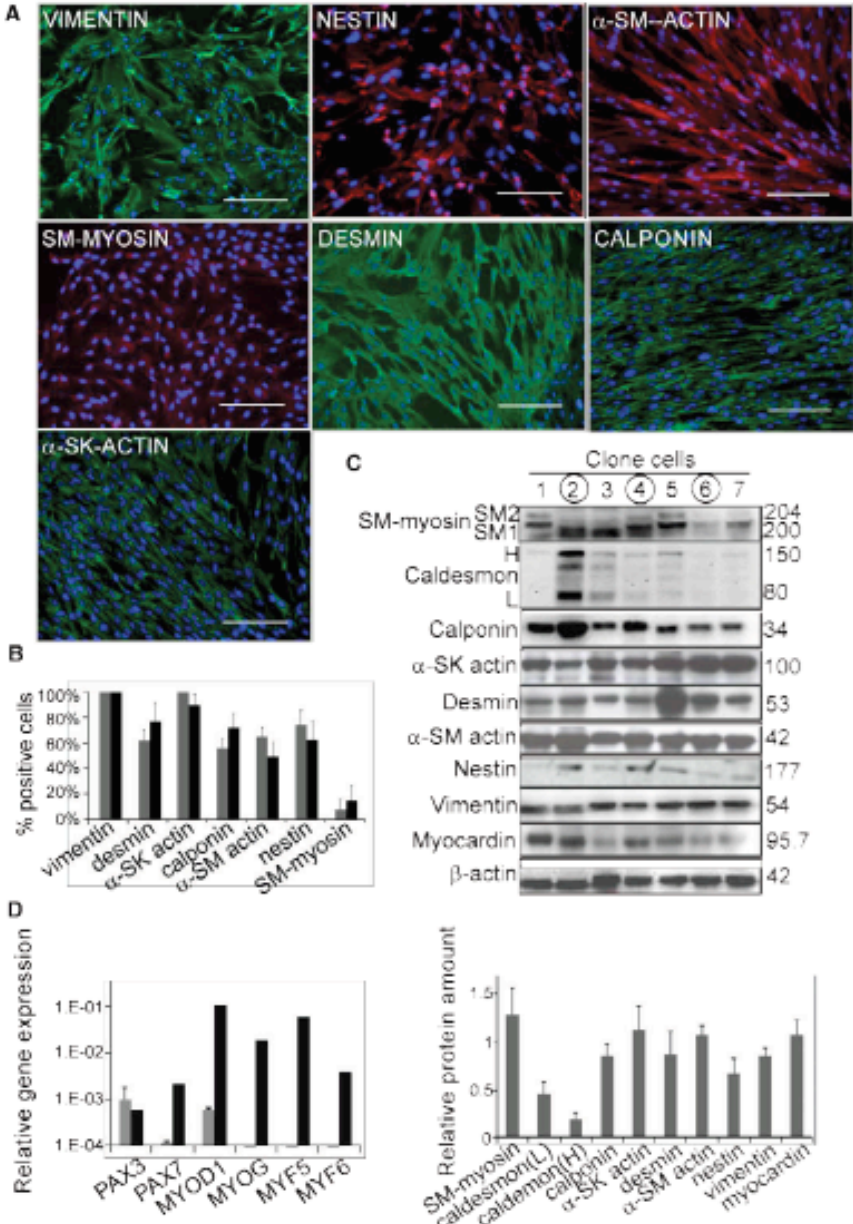


Figure 3: Myogenic Differentiation of Clones A) Immunofluorescence studies for the representative clone c4FL3 using antibodies against vimentin, nestin, α -smooth muscle actin (α -SM-actin), SM-myosin, desmin, calponin and α -sarcomeric actin (α -SK-actin). Bars: 25 μ m. **B)** Percentage of positive cells for the different markers in immunofluorescence studies (like those illustrated in A). Values are expressed as mean \pm SEM. Results for primary layers (n=9, gray bars) and clones (n=7, black bars). Differences are not significant. **C)** Western blot analyses. Upper panel: Western blot analyses for SM-myosin, caldesmon, calponin, α -SK actin, desmin, α -SMA, nestin, vimentin and myocardin in 7 clones. Encircled numbers indicate clones c4FL3, c3FL8 and c7FL8. Lower panel: corresponding densitometry data (mean \pm SEM; value for each protein related to that of β -actin). **D)** Q-RT-PCR data for transcription factors implicated in skeletal muscle differentiation (PAX3, PAX7, MYOD1, MYOG, MYF5, MYF6) in 3 clones (c4FL3, c3FL8 and c7FL8) and in normal human cultured myoblasts. Values are expressed as mean \pm SEM of gene expression normalized to that of GAPDH ($\Delta\Delta$ method). Gray bars: clones; Black bars: myoblasts.

expressed SSEA-4 (Supplementary Figure 1B). Moreover, there was no expression of NANOG and OCT4 proteins, and the marginal transcriptional expression of *NANOG*, *POU5F1* and *SOX2* was 2-3 log levels lower when compared to human Embryonic Stem Cells (hESCs), contrasting with the high expression of *MYC* and *KLF4* transcripts (at levels similar to those in hESCs) (Supplementary Figure 1C,D). The *MYC* proto-oncogene protein was also detected in clonal cells (Supplementary Figure 1D).

Human FL MSC clones express some early hepatic transcription factors but no cytoplasmic markers characteristic of developing hepatocytes

MSCs have been shown to exhibit specific features related to the tissue they were initially isolated from. Therefore, we assessed characteristics related to the hepatic origin of the MSC clones. Among the transcription factors implicated in hepatic differentiation and development we detected marginal expression of the *HNF1a* and *FOXA2* transcripts while *HNF1b* was expressed at a level similar to that of the HuH7 human hepatocarcinoma cell line (Figure 4Aa). The Hepatocyte nuclear factor (HNF)1a, 1b and 3b proteins were expressed primarily in the nucleus with a scattered pattern for HNF3b that was not discerned in the nuclei of the HuH7 cell line (Figure 4Ab). In addition, α -fetoprotein and albumin, which are expressed in the cytoplasm of developing hepatocytes, were not detected. We also showed the high expression of the mRNAs encoding *SNAIL*, *SNAIL2* and *TWIST* transcription factors known to regulate the mesenchymal-to-epithelial transition (Figure 4Ac) [29].

Clonogenic cells appears to derive from a population of fetal liver pericytic-like vascular cells

Paraffin embedded fetal liver sections were stained with a panel of antibodies directed at antigens specific for the various liver cell populations. As expected, hepatoblasts were uniformly positive for E-cadherin and cytokeratin 18, while biliary cells and Kupffer cells were positive for cytokeratin 19 and CD68, respectively (Supplementary Figure 2). Rare cells on the abluminal side of the endothelium lining large sinusoids and centro-lobular sinusoids expressed α -SM actin, nestin and vimentin, but did not express CD34 (Figure 4B). These cells were therefore clearly distinct through their morphology, location and phenotype from endothelial cells.

Discussion

Here we describe a population of 11-12 GW human fetal liver clonogenic cells that give rise in culture to myogenic cells with mesenchymal (osteoblastic, adipocytic and chondrocytic) potential. These cells appear to be derived from a population of fetal liver mural vascular cells selected by their adherent properties and expanded, under our culture conditions, at the expense of the other liver cell types.

Although the clonogenic cells we developed gave rise in culture to cells expressing the usual human BM MSC membrane markers [1,30-32] and could be induced to differentiate into the usual mesenchymal lineages, they differed from BM MSCs by a number of characteristics. Firstly, the cloning efficiency was superior in FL MSCs compared to BM MSCs. In particular, the FL clones could be generated from primary layers at passage 1 whereas BM MSC clones could, in our experience, only be derived at culture inception [28]. Secondly, the heterogeneity of CD146 expression did not predict the differentiation potential of the FL MSCs contrary to what has been described for BM MSCs [33]. Thirdly, in order to stimulate the adipocytic differentiation potential of the clonal cells, the adipogenic cocktail had to be enriched by adding

rosiglitazone and insulin to dexamethasone, IBMX and indomethacin. Moreover, despite the modified conditions, adipogenesis was delayed by more than 10 days when compared to BM cells. These results suggest that the activation of multiple signaling pathways in fetal cells is required to achieve adipogenic differentiation. Fourthly, in expansion medium not supplemented with specific vasculogenic inducers, the clonogenic cells differentiated into vascular smooth muscle cells expressing specific skeletal muscle transcription factors. The latter observation indicates that, in contrast to trilineal BM MSCs [28], FL MSCs are quadripotential, displaying both mesenchymal and myogenic differentiation potential. Moreover, the default differentiation pathway of the FL MSCs appears to be vasculogenic, whereas in BM MSCs it is osteogenic [34]. An additional difference between BM and FL MSCs was the expression of different markers characteristic of the hepatocytic lineage in FL MSCs. We identified the expression, both at the mRNA and protein level, of the transcription factors *FOXA2* and *HNF1b* known to be critical for the proper commitment to and differentiation into the hepatocytic lineage during development [35,36]. However, no other hepatic-specific cytoplasmic markers such as albumin or α -fetoprotein normally expressed at later stages of hepatocyte differentiation were detected. Moreover, we observed the expression of transcripts such as the zinc finger transcription factor *SNAIL* known to critically impede the mesenchymal-to-epithelial transition [29]. The simultaneous expression of transcription factors either favoring or hampering the differentiation into hepatocytes suggests that these cells may be in a poised state in which the genes required for hepatocytic differentiation are repressed. Further studies are required to demonstrate that the promoters of the marginally expressed hepatic transcription factors are associated to chromatin in bivalent state and to show that, in the presence of chromatin remodelers specific growth factors and extra-cellular matrices, these cells are able to differentiate into bipotential (hepatocytic and biliary) hepatic progenitors.

The use of fetal cells for cell therapy in humans cannot be envisioned unless to provide proof of concept in very particular circumstances, as exemplified for Parkinson's disease [37]. However, lessons might be taken from the study of fetal cells. In the present case, we show that cells akin to BM MSCs may acquire, at a distinct developmental stage and precise anatomical location, some features characteristic of hepatocytes. This suggests that it may be relatively easy to reprogram BM MSCs into hepatocytes by providing factors (cytokines, morphogens and adhesion molecules) present in the fetal liver microenvironment. Future studies have to be devised following this approach since new sources of cells are absolutely needed for transplantation in patients with liver insufficiency [38].

In conclusion, the cells described here appear to correspond to MSCs according to their phenotype, proliferative capacity and their differentiation potential to the mesenchymal lineages. However, they differ from BM MSCs in other differentiation patterns, mainly their capacity to differentiate into mural vascular cells (akin to smooth muscle cells or pericytes) and to express some master hepatogenic transcription factors. The vascular mural origin and differentiation potential is in agreement with the cell location at this stage when the vascular system organizing the hepatic trabeculae undergoes major extension. The expression of hepatocytic markers suggests that these cells may also contribute to the hepatic cord, which has to be further substantiated. The acquisition by cells collectively described as "MSCs" of properties specific to their location and developmental stage is related to the known plasticity of the mesenchyme, i.e. its capacity to modulate its properties according to external conditions [28,39,40]. This plasticity may explain the activation, in the fetal liver cells

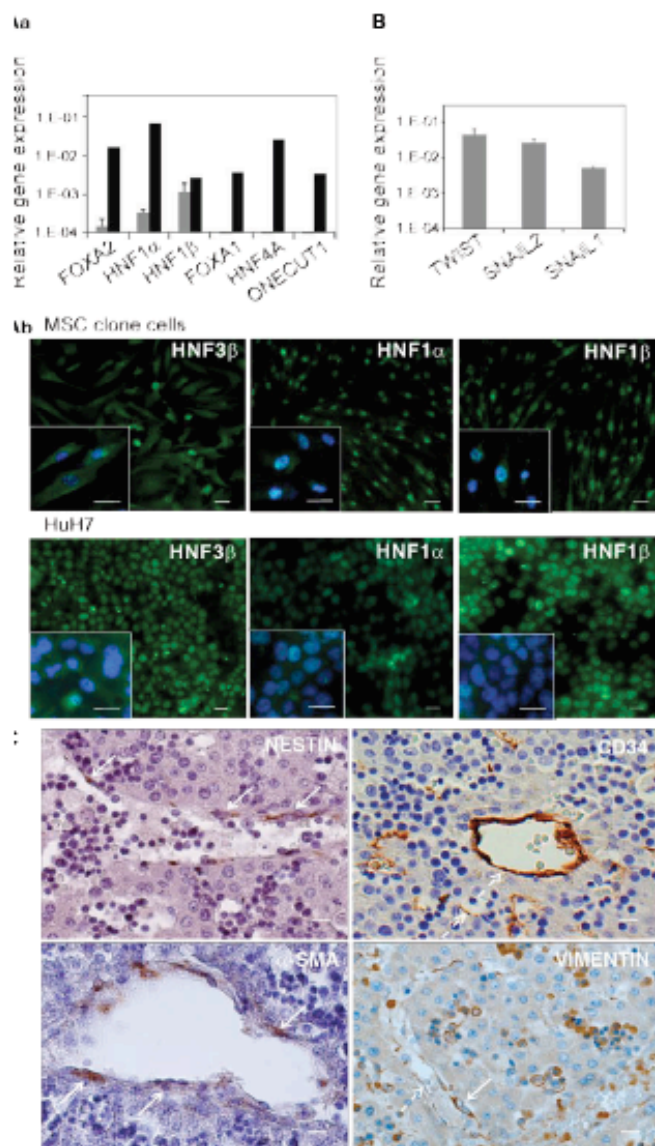


Figure 4: Analysis of the hepatocytic differentiation pathway and anatomical study

A) Hepatocytic differentiation pathway

a) Q-RT-PCR data for hepatic nuclear transcription factors in 3 clones (c4FL3, c3FL8 and c7FL8). Values are expressed as mean \pm SEM of gene expression normalized to that of GAPDH ($\Delta\Delta Ct$ method). Gray bars: clones; Black bars: human hepatocytic HuH7 cell line

B) Epithelial to mesenchymal transition

Q-RT-PCR data for transcription factors SNAI1, SNAI2 and TWIST implicated in epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in 3 clones (c4FL3, c3FL8 and c7FL8). Values are expressed as mean \pm SEM of gene expression normalized to that of GAPDH ($\Delta\Delta Ct$ method).

C) Anatomical study

In situ marker localization of the potential cell population of origin of MSCs in human 11-12 GW fetal liver. Immunohistochemistry using antibodies against nestin, CD34, α -SMA and vimentin. Continuous arrows indicate pericytes; broken arrows indicate endothelial lining. Bars: 10 μ m.

described here, of genes and pathways less prominent or extinct in the corresponding bone marrow cells.

Acknowledgment

The authors thank Jean-Thomas Vilquin (INSERM UMR5 974 / CNRS UMR 7215 / UPMC), Anne Weber, Clara Steichen (INSERM UMR5 972/ Univ ParisSud 11) for providing cell samples, cell lineages and HESG pictures, respectively; they are also grateful to Denis Clay for cell sorting, to Olivier Trassard (IFR93, Kremlin-Bicêtre) for imaging expertise, and to Marie-Thérèse Groyer-Picard and Sylvie Gouinlet-Mainot for excellent technical support. Finally, the authors are grateful to Zora Hannoun for careful reading and editing of the manuscript. WZ was supported by fellowships from INSERM and Région Île de France (DIM Stem Pôle). ZH was supported by the INCA grant BORTES and a fellowship from NRB. GP was supported by a fellowship from NRB.

References

- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, et al. (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284: 143-147. [PubMed]
- Caplan AJ, Dennis JE (2006) Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *Journal of Cellular Biochemistry* 98: 1076-1084.
- Phinney DG, Prockop DJ (2007) Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair—current views. *Stem Cells* 25: 2896-2902. [PubMed]
- Baron R, Storb R (2012) Mesenchymal stromal cells: a new tool against graft-versus-host disease? *Biology of blood and marrow transplantation. Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 18: 822-840. [PubMed]
- Dominguez-Bendala J, Lanzoni G, Invernizzi L, Ricordi C (2012) Concise review: mesenchymal stem cells for diabetes. *Stem Cells Transl Med* 1: 59-63. [PubMed]
- Singer NG, Caplan AJ (2011) Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation. *Annu Rev Pathol* 6: 457-478. [PubMed]
- Tyndal A, Uccelli A (2009) Multipotent mesenchymal stromal cells for autoimmune diseases: teaching new dogs old tricks. *Bone Marrow Transplantation* 43: 821-828. [PubMed]
- Caplan AJ (1991) Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 9: 641-650. [PubMed]
- Friedenstein AJ, Chalikyan RK, Lalykina KS (1970) The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell and tissue kinetics* 3: 393-403. [PubMed]
- Satja NK, Singh VK, Verma YK, Gupta P, Sharma S, et al. (2009) Mesenchymal stem cell-based therapy: a new paradigm in regenerative medicine. *J Cell Mol Med* 13: 4385-4402. [PubMed]
- Vincent C, Bouffé C, Merceron C, Goulet J, Brondello JM, et al. (2009) Cartilage tissue engineering: towards a biomaterial-assisted mesenchymal stem cell therapy. *Curr Stem Cell Res Ther* 4: 318-329. [PubMed]
- Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, Marx JC, Neel MD, et al. (2002) Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 8932-8937. [PubMed]
- Briquet A, Dubois S, Bekaert S, Dolhet M, Beguin Y, et al. (2010) Prolonged ex vivo culture of human bone marrow mesenchymal stem cells influences their supportive activity toward NOD/SCID-repopulating cells and committed progenitor cells of B lymphoid and myeloid lineages. *Haematologica* 95: 47-56. [PubMed]
- Charbord P (2010) Bone marrow mesenchymal stem cells: historical overview and concepts. *Hum Gene Ther* 21: 1045-1056. [PubMed]
- Dennis JE, Carillet JP, Caplan AJ, Charbord P (2002) The STRO-1+ marrow cell population is multipotent. *Cells Tissues Organs* 170: 73-82. [PubMed]
- Majumdar MK, Thiede MA, Haynesworth SE, Bruder SP, Gerson SL (2000) Human marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) express hematopoietic cytokines and support long-term hematopoiesis when differentiated toward stromal and osteogenic lineages. *Journal of Hematology & Stem Cell Research* 9: 841-848. [PubMed]
- Prockop DJ (1997) Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276: 71-74. [PubMed]
- Wagner W, Roderburg C, Wein F, Diehlmann A, Frankhauser M, et al. (2007) Molecular and secretory profiles of human mesenchymal stromal cells and their abilities to maintain primitive hematopoietic progenitors. *Stem Cells* 25: 2638-2647. [PubMed]
- Campagnoli C, Roberts JA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, et al. (2001) Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood* 98: 2396-2402. [PubMed]
- Crisan M, Yap S, Castella L, Chen CW, Corselli M, et al. (2008) A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell* 3: 301-313. [PubMed]
- da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB (2006) Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of Cell Science* 119: 2204-2213. [PubMed]
- Wang XY, Lan Y, He WY, Zhang L, Yao HY, et al. (2008) Identification of mesenchymal stem cells in aorta-gonad-mesonephros and yolk sac of human embryos. *Blood* 111: 2436-2443. [PubMed]
- Stroga M, Wiswanathan S, Darinskas A, Siab Y, Michalek J (2012) Same or not the same? Comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells. *Stem Cells Dev* 21: 2724-2752. [PubMed]
- Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA (2007) Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circulation research* 100: 1249-1260. [PubMed]
- Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JJ, et al. (2002) Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 13: 4279-4295. [PubMed]
- da Silva Meirelles L, Caplan AJ, Nardi NB (2008) In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 26: 2287-2299. [PubMed]
- Delorme B, Charbord P (2007) Culture and characterization of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Methods Mol Med* 140: 67-81. [PubMed]
- Delorme B, Ringe J, Pontikoglou C, Gallard J, Langonne A, et al. (2009) Specific Lineage-Priming of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Provides the Molecular Framework for Their Plasticity. *Stem Cells* 27: 1142-1151. [PubMed]
- Thiery JP, Aclouque H, Huang RY, Nieto MA (2009) Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139: 871-890. [PubMed]
- Delorme B, Ringe J, Gallay N, Le Vern Y, Kerboeuf D, et al. (2008) Specific plasma membrane protein phenotype of culture-amplified and native human bone marrow mesenchymal stem cells. *Blood* 111: 2631-2635. [PubMed]
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, et al. (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8: 315-7. [PubMed]
- Pontikoglou C, Delorme B, Charbord P (2008) Human bone marrow native mesenchymal stem cells. *Regen Med* 3: 731-741. [PubMed]
- Russell KC, Phinney DG, Lacey MR, Barnileaux BL, Meyertholen KE, et al. (2010) In vitro high-capacity assay to quantify the clonal heterogeneity in trilineage potential of mesenchymal stem cells reveals a complex hierarchy of lineage commitment. *Stem Cells* 28: 788-798. [PubMed]
- Muraglia A, Cancedda R, Quarto R (2000) Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J Cell Sci* 113: 1161-1166. [PubMed]
- Kymizli I, Halzls P, Kaltraki N, Tronche F, Gonzalez FJ, et al. (2006) Plasticity and expanding complexity of the hepatic transcription factor network during liver development. *Genes Dev* 20: 2293-2305. [PubMed]
- Lee GS, Friedman JR, Fulmer JT, Kaestner KH (2005) The initiation of liver development is dependent on Foxa transcription factors. *Nature* 435: 944-947. [PubMed]
- Peschanski M, Defer G, N'Guyen JP, Ricotti F, Montfort JC, et al. (1994) Bilateral motor improvement and alteration of L-dopa effect in two patients with Parkinson's disease following intrastriatal transplantation of fetal ventral mesencephalon. *Brain* 117: 487-499. [PubMed]
- Vacanti JP, Kulig KM (2014) Liver cell therapy and tissue engineering for transplantation. *Seminars in Pediatric Surgery* 23: 150-155. [PubMed]

Citation: Zhang W, Hamidouche Z, Pourcher G, Gribova V, Haghighi F, et al. (2014) A Population of Human Mesenchymal Stem Cells Specific to the Fetal Liver Development. J Stem Cell Res Ther 4: 238. doi:10.4172/2157-7633.1000238

Page 9 of 9

39. Park SR, Oreffo RO, Triffitt JT (1999) Interconversion potential of cloned human marrow adipocytes in vitro. Bone 24: 549-554. [PubMed]

40. Song L, Tuan RS (2004) Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow. FASEB J 18: 980-982. [PubMed]

Citation: Zhang W, Hamidouche Z, Pourcher G, Gribova V, Haghighi F, et al. (2014) A Population of Human Mesenchymal Stem Cells Specific to the Fetal Liver Development. J Stem Cell Res Ther 4: 238. doi:10.4172/2157-7633.1000238

Submit your next manuscript and get advantages of OMICS Group submissions

Unique features:

- User friendly/feasible website-translation of your paper to 50 world's leading languages
- Audio Version of published paper
- Digital articles to share and explore

Special features:

- 150 Open Access Journals
- 10,000 editorial team
- 21 days rapid review process
- Quality and quick editorial, review and publication processing
- Indexing at PubMed (partial), Scopus, ESCO, Index Copernicus and Google Scholar etc
- Sharing Options Social Networking Enabled
- Authors, Reviewers and Editors rewarded with online Scientific Credits
- Better discount for your subsequent articles

Submit your manuscript at <http://www.omicsonline.org/submit.htm>

4.2.3. Article 3: *Stem Cells International*, 2015 (Accepté Decembre 2015)

Hepatocytic differentiation potential of human fetal liver Mesenchymal Stem Cells: *in vitro* and *in vivo* evaluation

Hoda El Kehdy*, Guillaume Pourcher*, Wenwei Zhang, Zahia Hamidouche, Sylvie Goulinet-Mainot, Etienne Sokal, Pierre Charbord, Mustapha Najimi*, Anne Dubart-Kupperschmitt*

* Equal contribution

ABSTRACT

In line with the search of effective stem cell population that would progress liver cell therapy and because the rate and differentiation potential of mesenchymal stem cells (MSC) decrease with age, the current study investigates the hepatogenic differentiation potential of human fetal liver MSCs (FL-CSMs). After isolation from 11-12 gestational week human fetal livers, FL-CSMs were shown to express characteristic markers such as CD73, CD90 and CD146, and to display adipocytic and osteoblastic differentiation potential. Thereafter, we explored their hepatocytic differentiation potential using the hepatogenic protocol applied for adult human liver mesenchymal cells. FL-CSMs differentiated in this way displayed significant features of hepatocyte-like cells as demonstrated *in vitro* by the up-regulated expression of specific hepatocytic markers and the induction of metabolic functions including CYP3A4 activity, indocyanine green uptake/release and glucose 6-phosphatase activity. Following transplantation, naïve and differentiated FL–MSC engrafted into the hepatic parenchyma of newborn immuno-deficient mice and differentiated *in situ*. Hence, FL-CSMs appeared to be interesting candidates to investigate the liver development at the mesenchymal compartment level. Standardization of their isolation, expansion and differentiation may also support their use for liver cell-based therapy development.

Stem Cells International

Hepatocytic differentiation potential of human fetal liver Mesenchymal Stem Cells: *in vitro* and *in vivo* evaluation

Short title: Hepatic differentiation of human fetal liver-MSCs

Hoda El Kehdy^{*1, 2, 3}, Guillaume Pourcher^{*1, 2, 3, 4}, Wenwei Zhang^{1, 2, 3}, Zahia Hamidouche^{1, 2, 3}, Sylvie Goulinet-Mainot^{1, 2, 3}, Etienne Sokal⁵, Pierre Charbord^{1, 2, 3}, Mustapha Najimi^{5*}, Anne Dubart-Kupperschmitt^{1, 2, 3*}

¹Inserm U972, Paul Brousse Hospital, F-94807, Villejuif, France ;

²UMR_S972, Université Paris-Sud, F-94807, Villejuif, France;

³Département Hospitalo-Universitaire Hepatinov, Hôpital Paul Brousse, F-94807, Villejuif, France;

⁴Département de Chirurgie digestive minimale-invasive, Hôpital Antoine Bécère, APHP, F-92141, Clamart, France ;

⁵Université Catholique de Louvain, Institut de Recherche Clinique et Expérimentale (IREC), Laboratory of Pediatric Hepatology and Cell Therapy, Brussels 1200, Belgium

* Equal contribution

Keywords: Fetal liver, mesenchymal stem cells, differentiation, hepatocyte, NOD/SCID newborn mice, transplantation, cell therapy

To whom correspondence should be addressed:

Anne Dubart-Kupperschmitt
INSERM UMRS_972
Bâtiment Lavoisier,
Hôpital Paul Brousse
94807, Villejuif, France
Email: anne.dubart@inserm.fr

footnote:

Pierre Charbord present address:

University Pierre and Marie Curie; IBPS Laboratory of Developmental Biology; UMR CNRS 7622, INSERM U1156

ABSTRACT

In line with the search of effective stem cell population that would progress liver cell therapy and because the rate and differentiation potential of mesenchymal stem cells (MSC) decrease with age, the current study investigates the hepatogenic differentiation potential of human fetal liver MSCs (FL-MSCs). After isolation from 11-12 gestational week human fetal livers, FL-MSCs were shown to express characteristic markers such as CD73, CD90 and CD146, and to display adipocytic and osteoblastic differentiation potential. Thereafter, we explored their hepatocytic differentiation potential using the hepatogenic protocol applied for adult human liver mesenchymal cells. FL-MSCs differentiated in this way displayed significant features of hepatocyte-like cells as demonstrated *in vitro* by the up-regulated expression of specific hepatocytic markers and the induction of metabolic functions including CYP3A4 activity, indocyanine green uptake/release and glucose 6-phosphatase activity. Following transplantation, naive and differentiated FL-MSC engrafted into the hepatic parenchyma of newborn immuno-deficient mice and differentiated *in situ*. Hence, FL-MSCs appeared to be interesting candidates to investigate the liver development at the mesenchymal compartment level. Standardization of their isolation, expansion and differentiation may also support their use for liver cell-based therapy development.

INTRODUCTION

Human mesenchymal stem cells (MSC) are gaining more and more interest for cell therapy purposes because of their stemness (capacity to self-renew and multipotentiality) and their property to secrete a number of anti-apoptotic and anti-inflammatory factors essential for tissue repair [1]. These features support their clinical applicability for autologous and, eventually, allogeneic transplantation. It is now accepted that MSCs are present, both in humans and in mice, not only in the bone marrow (BM), but also in many adult and fetal tissues [2,3]. However, MSCs from different origins may present specific characteristics and properties. In particular, it has been shown that human fetal liver (FL) MSCs display specific characteristics as compared to those of BM, i.e. lesser immune suppressive capacity, larger expansion potential, longer telomeres and higher telomerase activity [4,5,6]. Such differences may be related to a distinct gene profile in FL-MSCs [7]. Moreover, we have recently observed that the differentiation default pathway was myogenic in FL-MSCs, contrarily to that of BM-MSCs known to be osteogenic [8].

In this work, we further explore the specificity of FL-MSCs, making the hypothesis that the site of origin of these cells would imprint on their characteristics. We show that FL-MSCs, cultured in conditions favoring the generation of hepatocyte-like cells from mesenchymal cells of human adult livers [9], could also differentiate into functional hepatocyte-like cells. Furthermore, 8 weeks after transplantation in the liver of newborn immunodeficient mice, both non-differentiated and differentiated FL-MSCs gave rise to foci of hepatocytes, showing that they are able to further differentiate *in vivo* into mature hepatocytes.

MATERIALS AND METHODS

Human Fetal Liver Mesenchymal Stem Cell isolation

Human fetal livers were carefully dissected from fetuses collected after voluntary pregnancy termination at gestational week (GW) 11-12 with the written mothers' consent, abiding by the ethical French guidelines and the amended Declaration of Helsinki. Fetal livers were incubated under slow agitation on a heating magnetic stirrer for 1 hour at 37°C with an enzyme mixture solution containing hyaluronidase (Sigma) and collagenases I and IV (Sigma). Recovered cells were suspended in 10mL of expansion medium α MEM (Gibco) supplemented with 10% fetal calf serum (Thermo scientific HYCLONE), 2mM glutamine (Gibco), 100 U/mL penicillin/streptomycin (Gibco) and 1ng/mL FGF2 (R&D Systems). Cell suspension was then filtered using a 70 μ m cell strainer (Falcon), centrifuged and washed three times using expansion medium at 50g for 5 min at room temperature. Cell pellets were suspended in expansion medium and seeded at density of $5.2 \times 10^4/\text{cm}^2$ on plastic culture flasks [8] and incubated at 37°C in fully-humidified atmosphere containing 5% CO₂. After 24h, medium was completely changed to eliminate non-adherent hematopoietic cells (95 % of cell population) and thereafter renewed every 3 days. At confluence, cells were detached with 0.25% w/v trypsin-EDTA for 3 min (Gibco) and seeded at density of 2.1×10^4 cells/cm². Cells from passage 3 to 5 were used for the characterization studies.

Flow cytometry

FL-MSCs were harvested with trypsin-EDTA, centrifuged at 1200 rpm for 5 min, and suspended in PBS supplemented with 0.1% bovine serum albumin (BSA). Cell aliquots (2×10^4 cells) were incubated for 20 min at 4°C with conjugated specific antibodies or corresponding isotypes (Table 1). Cells were then washed and suspended for analysis using Accuri C6 flow cytometer and CyFlow software (BD Biosciences).

Immunofluorescence

FL-MSCs grown on collagen type I coated labtek were fixed with 4% paraformaldehyde (Sigma) for 15 min at room temperature and permeabilized with 0.1 % Triton X-100 (Sigma) for 10 min. Non-specific

immunostaining was prevented by 30 min incubation in PBS with 3% (w/v) BSA. Cells were incubated for 1 hour with primary antibodies at room temperature (see Table 1). After washing step, cells were incubated for 30 min with secondary antibodies at room temperature (Table 1). Nuclei were stained for 5 min with DAPI (Life technologies). Slides were mounted in fluoromount medium (Sigma). Fluorescence was assessed using Imager A1 fluorescent microscope (Carl Zeiss) and digital images were acquired using Axiovision Software.

***In vitro* mesenchymal differentiation**

To induce adipogenic differentiation, FL-MSCs were seeded at 20 000 cells/cm² and treated with adipogenic medium for 21 days with medium change 3 times weekly. Adipogenic medium consists in DMEM-high glucose (4,5g/L) (Gibco) supplemented with 10 % fetal calf serum, 1μM dexamethasone (Sigma), 0,5 mM isobutyl-methylxanthine (IBMX) (Sigma), 60μM indomethacin (Sigma), 1μg/L Insulin (Sigma) and 10μM rosiglitazone (Santa Cruz). Adipogenesis was assessed by oil red O staining (Sigma) after 21 days.

To induce osteogenic differentiation, cells were seeded at 15.000 cells/cm² treated with osteogenic medium for 21 days with medium change 3 times weekly. Osteogenic medium consists in DMEM-high glucose with 10 % fetal calf serum, 0.1μM dexamethasone (Sigma), 25μg/mL L-ascorbic acid (Sigma) and 3mM NaH₂PO₄ (Sigma). Osteogenesis was assessed by alkaline phosphatase activity (Sigma) and alizarin red (Sigma) staining after 6 and 21 days, respectively.

***In vitro* hepatocytic differentiation**

Hepatocytic differentiation was induced as described previously with minor modifications [9]. FL-MSCs were seeded at a density of 1 x 10⁴/cm² on rat tail collagen type I (BD) coated flasks (Falcon) using expansion medium. After 24 hours, cells were cultured in serum free IMDM medium (Gibco) supplemented with 20 ng/mL epidermal growth factor (R&D Systems) and 10 ng/mL FGF2 (Peprotech). Forty-eight hours later, cell differentiation was induced after incubation with IMDM containing 20 ng/mL Hepatocyte growth factor (Peprotech), 10 ng/mL FGF2 and 0,61g/L nicotinamide (Sigma). Seven days later cell maturation was induced using IMDM containing 20 ng/mL

Oncostatin M (Peprotech), 1 μ M dexamethasone (Sigma) and 50mg/mL ITS premix (BD). For the last two steps, the medium was changed every 3 days. At the end of each step, mRNA expression level was studied. At the end of the whole differentiation process, quality of hepatogenic differentiation was concomitantly evaluated at the morphology, phenotype and functional levels.

Undifferentiated cells used both in in vitro and in vivo studies represent FL-MSC seeded and cultured in the same conditions using IMDM containing 2% FCS and 1% P/S and with no growth factor or cytokine.

Uptake of low-Density Lipoprotein (LDL)

Differentiated and non-differentiated FL-MSCs were incubated with 5 μ g/ml Dil (1,10-dioctadecyl-1'-3,3,3',3'-tetramethyl-indo-carbocyaninperchlorate) conjugated to LDL (Biomedical technologies) for 3 hours at 37 °C, then washed 3 times with serum free medium and 3 times with PBS 1x. Thereafter, cells were fixed with 3% paraformaldehyde for 2 min and mounted with fluoromount medium. Red fluorescence was assessed using Imager A1 microscope (Carl Zeiss) and digital images were acquired using Axiovision Software.

Glucose-6-Phosphatase (G6Pase) activity assay

Cells were washed 2 times with PBS then incubated in 2 mL of buffer 0.1 M Tris-acetate, pH 6.5, containing 2.08 mM glucose-6-phosphate and 2.4 mM nitric lead at 37°C in humidified atmosphere containing 5% CO₂. Glucose-6-phosphate is in these conditions transformed into glucose and the nitrate will precipitate. Four hours later, supernatant was eliminated and cells were washed for 10 sec in 1 mL of 5% ammonium sulfide to convert lead nitrate into brownish lead sulfate. Cells were examined using HP50 inverted microscope coupled to a DFC camera (Leica, Switzerland). Digital images were acquired using Leica IM50 Image Manager Software.

Indocyanine green (ICG) uptake and release

Indocyanine green is a non-toxic organic anion exclusively eliminated by hepatocytes through the LTS1 (Liver-Specific organic Transporter-1). For detection of cellular uptake of ICG, differentiated and undifferentiated FL-MSCs were incubated for 1 hour with 1 mg/mL ICG (Sigma) at 37°C. ICG was

cleared after overnight incubation. The uptake and the clearance of ICG were assessed using a white light inverted microscope.

Cytochrome P450 3A4 Metabolic Activity Assay

We used the P450-Glo CYP3A4 assay where the measurement of luciferase reports the P450 cytochrome activity (Promega). Briefly, FL-MSCs were incubated with IMDM containing 50 μ mol luciferin-IPA, at 37°C. Three hours later, 50 μ L of medium was transferred in a 96-well opaque white plate (Costar), mixed with 50 μ L of luciferin detection reagent and incubated for 20 min at room temperature. Luminescence was measured using a Victor3 luminometer.

Quantitative real-time reverse transcription – polymerase chain reaction

At the end of each step of the differentiation process, both undifferentiated and differentiated FL-MSC were recovered for total RNA extraction using the TriPure isolation reagent (Roche). After extraction, RNA was quantified using a NanoDrop (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). First-strand cDNA was synthesized using a superscript II cDNA synthesis kit according to the manufacturer's instructions (Invitrogen) and subsequently diluted with nuclease-free water (Invitrogen) to 10 ng/mL cDNA. PCR amplification mixtures (25 μ L) contained 25 ng template cDNA, Master Mix buffer (12.5 μ L; Applied Biosystems), and 300 nM forward and reverse primer. PCRs were run in duplicate and performed on a StepOnePlus Real-time PCR (Applied Biosystems). The cycling conditions comprised 10 min polymerase activation at 95°C and 40 cycles at 95°C for 15 s and 60°C for 20 s and 72°C for 10 min. Each PCR was followed by a melting curve analysis. Relative quantification was normalized against the house keeping gene GAPDH and/or PPIA. The AB primers and probes used for the current study are listed in Table 2.

Mice Transplantation

Animal studies of the current work were conducted according to protocols approved by the local ethic committee (C2EA-26: Comité d'éthique en expérimentation animale de l'IRCIV; #509/2015062215414016). Differentiated and non-differentiated FL-MSCs were detached using trypsin-EDTA solution, centrifuged, washed, and suspended at 10⁵ cells/35 μ L of physiological serum.

Newborn (2 days) NOD/SCID mice were intra-hepatically injected using a 0.5 ml insulin syringe (31G) (n=6 for each group). Eight weeks post-transplantation, animals were sacrificed. Livers were harvested and fixed in 4% formaldehyde solution then embedded in paraffin for immunohistochemistry analyses.

Immunohistochemistry

Five µm-thick liver sections of NOD/SCID mice were deparaffinized and rehydrated in graded alcohol, then endogenous peroxidase activity was blocked by incubation for 15 min in a 3% hydrogen peroxide methanol solution (Prolabo). To retrieve the antigens, liver sections were incubated in citric acid monohydrate solution (Dako) at 97°C for 90 min. To block non-specific staining, sections were incubated for 1h in 5% normal goat serum (Sigma) diluted in PBS at room temperature. Slices were incubated overnight with polyclonal anti-human Albumin (Calbiochem, UK), polyclonal anti-human Ornithine transcarbamylase (OTC) (Sigma, Belgium) in 2% normal goat serum at 4°C. After incubation of the slices with Envision Dako anti-mouse or anti-rabbit (Dako, Belgium) (Table 1), staining was visualized using the chromogenic substrate diaminobenzidine (Sigma, Belgium). Counterstaining was performed using Mayer's hematoxylin (Sigma-Aldrich) for 5 min and mounted using Neo-Entellan Mounting Medium (Merck) for analysis. Mounted slides were examined using HP50 inverted microscope coupled to a DFC camera (Leica, Switzerland). Digital images were acquired using Leica IM50 Image Manager Software. Liver slice samples of transplanted mice were compared to both human liver and non-transplanted mice

Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Analyses were done using the GraphPad Prism software program (San Diego, California, USA). Statistical differences were determined by Student's *t* test for two groups' comparison. Differences were considered significant when *p* values **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001.

RESULTS

Characterization of isolated naive FL-MSCs

Four different fetal livers (GW 11-12) were digested using collagenase and cells were isolated. For all donors, cell viability estimated by trypan blue exclusion always exceeded 90%. After subsequent plating and first enrichment by plastic adherence, cells with fibroblastic shape started proliferating after the third day post-plating and confluence was reached after 7-10 days (Figure 1A). While emerging cell populations were heterogeneous before the first detachment, cells presenting mesenchymal morphology became predominant after the first passage (Figure 1A). The mesenchymal phenotype of the cells was then demonstrated using flow cytometry which revealed their immuno-positivity for CD73, CD90 and CD146 and immuno-negativity for hematopoietic CD45 and endothelial CD34 and CD31 markers (Figure 1B). Using immunofluorescence, we also showed that the whole FL-MSC population was immuno-positive for vimentin and nestin (type III and VI intermediate filaments, respectively), well described in MSC of other sources (Figure 2). We also demonstrated that smooth muscle (SM) cell markers calponin, α SM actin and desmin are positively expressed in all analyzed passages. Upon adipogenic differentiation, FL-MSCs accumulated intracellular lipid droplets as revealed by oil Red O staining (Figures 3A & 3B). Upon osteogenic differentiation, differentiated FL-MSCs showed calcium phosphate precipitates as revealed by alkaline phosphatase activity (Figures 3C & 3D) and alizarin Red staining (Figures 3E & 3F). All these features confirmed the MSC phenotype of the fibroblastoid cells we isolated from fetal liver **as previously reported by our team [8]**.

In vitro Hepatocytic differentiation

Twenty four hours after seeding, FL-MSCs were sequentially treated with several growth factors/cytokines to induce hepatocytic differentiation as previously documented (see M&M). After 3-4 weeks in culture, a change in morphology was observed with acquisition of a polygonal, instead of fibroblastoid, shape and increased cytoplasmic granularity (Figure 4A). **Noteworthy, this change in morphology is very homogeneous throughout the culture whatever the primary cell sample used for the experiment. First we analyzed using RT-qPCR the kinetic of hepatocytic differentiation by**

analyzing the mRNA expression levels of stem, mesenchymal and hepatocytic markers at the end of each step of the differentiation process. The expression of all studied stem and mesenchymal markers (Sox17, sox9, Cxcr4 and α -SM actin) was up-regulated after the two first steps of the differentiation process (Figure 4B). Thereafter, a down-regulation was observed at the last maturation phase except for α -SM actin for which expression remains at the levels of undifferentiated FL-MSC. For studied hepatic markers albumin, MPR2 and CDH1, if upregulation was noticed at the end of the whole differentiation process for all the markers, their kinetic remains different. MRP2 mRNA expression was up-regulated since the first step of the differentiation process, albumin expression up-regulation happens when only HGF is added to the cells whereas CDH1 is upregulated only at the last maturation step (Figure 4B). ~~Stem-cell marker *POU5F1 (OCT 4)*, *SOX9*, *SOX17*, and *CXCR4*, early liver development marker *CEBPB* as well as biliary marker *KRT19 (CK-19)* gene expressions were clearly down-regulated in differentiated FL-MSCs as compared to undifferentiated counterpart. Conversely, we observed a significant increase in the mRNA expression of hepatic markers albumin (*ALB*) and tryptophan-2,3-dioxygenase (*TDO2*) gene expressions (4 fold and 45 fold increase as compared to undifferentiated cells, respectively) (Figure 4B).~~

Using immunofluorescence, we confirmed the positive protein expression of hepatic markers albumin and α -foetoprotein (AFP) in differentiated FL-MSCs (Figure 4C). Immunofluorescence studies also indicated major changes in the expression of hepatocyte transcription factors. In differentiated FL-MSCs, HNF4 α and HNF6 expression were both induced whereas HNF1 α and HNF3 β were enhanced and translocated to the nucleus, respectively (Figure 4D). Thereafter, we evaluated the metabolic functionality of the differentiated FL-MSCs as compared to non-differentiated counterparts. After incubation with an exogenous luciferin-IPA substrate, the intensity of luminescence (reporting the activity of CYP3A4) was significantly induced in differentiated FL-MSCs (~3 fold, $p < 0.01$) (Figure 5A). Dil-LDL uptake was detected in undifferentiated FL-MSCs, while it was more enhanced in differentiated cells (Figure 5B). Similar results were obtained for Glucose-6-phosphatase activity, the final key enzyme of *de novo* glucose production [9], the expression of which was more consistent in

differentiated FL-MSCs as compared to undifferentiated cells. In contrary, only differentiated FL-MSCs were able to take up indocyanine green (ICG) after only 1 hour incubation. The differentiated cells also display the potential to release the up taken ICG after 18h, a function exclusively performed by liver cells, (Figure 5C).

Cell engraftment and hepatocyte differentiation *in vivo*

To evaluate the FL-MSC potential to engraft within a liver, we transplanted newborn NOD-SCID mice intra-hepatically using 10^5 cells, ~~undifferentiated or differentiated~~. Eight weeks post-transplantation, mice were sacrificed and liver sections were analyzed for cell engraftment and *in situ* differentiation. We analyzed, using human-specific antibodies, albumin and ornithine transcarbamylase (OTC) expression to track the injected human cells. We observed, in consecutive liver slices, positive immunostaining for both human albumin and OTC which indicated that cells have differentiated *in situ* (Figure 6). ~~We detected more engrafted human cells in the group of mice transplanted with differentiated FL-MSCs (Figure 6).~~ Scattered human cells were noticed in all analyzed mouse livers but most cells were detected as foci next to the portal vascular structures (Figure 6). ~~When evaluating his parameter has been evaluated using morphometry on scanned slices and by manually counting of the positive cells. Both approaches clearly revealed no differences in the number of positive human cells in both group of cells. Hence, correction of the information has been made in the revised version of the manuscript.~~

DISCUSSION

The current study indicates that MSCs isolated from human 11-12 GW fetal livers, can differentiate into hepatocyte-like cells *in vitro* when cultured following a specific protocol and *in vivo* after being intra-hepatically transplanted in newborn immune deficient mice.

Plastic adherence and stringent culture conditions have led to select non-hematopoietic, spindle shaped, and highly proliferative cells. Even at very low density seeding, non-hematopoietic cells efficiently adhered to the substrate and yielded, after a few passages, a significant population of fibroblastoid cells with no contaminating hematopoietic or hepatoblastic cells. Although, hepatoblast-like cells do form small colonies on the dish, such cell colonies do not proliferate. Because culture dishes were not coated with collagen and the culture medium used is not optimal for their culture/proliferation. However, it is difficult to exclude that this small proportion of cells is maintained in the culture and possibly has undergone EMT. Nevertheless, our team has previously demonstrated the high cloning efficiency of the fibroblastoid fetal liver cells on which MSC identity has been confirmed. In that study, we also demonstrated nonsignificant differences between the isolated clones and the primary FL-MSC population in terms of morphology and gene expression.

The isolated fibroblastoid liver cells could be easily expanded up to 15 passages [8]. These cells also fulfilled the other basic criteria for MSC as they exhibited the characteristic surface antigen profile (positivity for CD90, CD73 and CD146 and negativity for CD45, CD31 and CD34) and the adequate intermediate filaments (vimentin and nestin). The typical MSC differentiation potential previously demonstrated for these cells [8] was also shown here for the osteogenic and adipogenic pathways. All these characteristics were shown to be maintained after cryopreservation/thawing. By comparison, multipotency and amplification potential significantly differentiated FL-MSCs from mesenchymal cells obtained from adult human healthy livers [9]. Distinguishing MSC and fibroblasts and thus isolation of the two populations from each other is barely achievable since they share the expression of numerous markers and there is no reliable specific marker expressed by one cell population vs the other one [appuyer par Ref].

We then investigated the potential of the FL-MSC populations to differentiate *in vitro* into hepatocyte-like cells following the procedure described for adult human liver mesenchymal stem/progenitor cells [9]. Sequential incubation with specific growth factors/cytokines (FGF2, HGF and Oncostatin M) was applied and several features at the morphological, phenotypic and functional levels were checked in both differentiated and untreated FL-MSCs. The significant morphological changes observed in all analyzed cell batches of differentiated FL-MSCs were quite comparable to what has been documented for other adult hepatic and extra-hepatic mesenchymal cell populations i.e. the polygonal shape and the increased cytoplasmic granularity [11,12]. Such changes were significantly correlated to an induced hepatogenic mRNA expression profile based on down-regulation of stemness markers such as *CXCR4*, *SOX9* and *SOX17* and up-regulation of *ALB* and *MRP2*. The protein expression profile after differentiation showed expression of α -fetoprotein and albumin, confirming the upregulation of *ALB* expression. We also observed that the HNF1 α and HNF3 β transcription factors, ectopically expressed in undifferentiated FL-MSCs [8], were significantly translocated to the nucleus. Conversely, HNF4 α and HNF6 that were not expressed before differentiation were induced in hepatogenic conditions. These data show that FL-MSCs display hepatocytic potential as other adult intra and extra-hepatic mesenchymal cells do [9,11,13]. The positive expression of hepatocyte nuclear factors before hepatogenic differentiation in FL-MSCs, as well as related high evolving potential towards a hepatic fate as compared to other MSCs of adult origin [14,8], supported their hepatic origin.

All the above mentioned features displayed after differentiation led to the investigation of metabolic functionalities. Here, we clearly show that undifferentiated FL-MSCs exhibited both LDL uptake and glucose 6-phosphatase activity and that these metabolic functions were more pronounced after hepatogenic differentiation. On the contrary, uptake/release of indocyanine green was not detected in undifferentiated FL-MSCs while displayed after hepatogenic differentiation, indicating their specific ability to display some membrane characteristics of the mature hepatocytes. Likewise, increase in CYP3A4 activity demonstrated the detoxification ability of differentiated FL-MSCs. Altogether these

results provide convincing evidence that FL-MSCs can differentiate *in vitro* into cells with significant range of mature hepatocyte functions.

Finally, we investigated the behavior of FL-MSCs *in vivo* after intra-hepatic transplantation in newborn NOD-SCID mice. This injection site allows potential availability of attachment factors and extracellular components for transplanted cells to be efficiently delivered and to overcome the acute cell clearance [15]. A mechanical process linked to cell delivery will lead to the entry of the transplanted cells into the vascular spaces. Such ischemic injury by activating many cell types and the secretion of substances will help the permeabilization of endothelial cells. Transplanted cells may then be able to cross of the endothelial barrier and to integrate the hepatocytes plates after *in situ* differentiation. Detecting human FL-MSC up to 8 weeks post-transplantation suggests their ability to survive and to achieve all these initial steps. This is in accordance with previously published results showing the ability of MSC from different sources to adapt to liver micro-environment [16]. In addition, the immuno-detection of human OTC suggests the potential of FL-MSC to differentiate *in situ* and to integrate the hepatocyte plates in the highly proliferative environment characteristic of the newborn liver mice. When undifferentiated or differentiated FL-MSC were transplanted any differences in term of engraftment level was noticed as revealed by morphometrical analysis or manual counting of human OTC immunopositive cell number in the recipient mouse livers (data not shown).

CONCLUSION

In conclusion, we show here that MSCs generated from 11-12 GW human fetal livers exhibit significant ability to differentiate into hepatocyte-like cells both *in vitro* and *in vivo*. Hence, FL-MSCs are interesting candidates for the investigation of liver development as well as for future cell-based therapy once standardization of the procedure to isolate and expand them will be achieved.

ACKNOWLEDGMENTS

The present work was supported by INSERM U972. HEK was supported by INSERM U972 and NRB (Nouvelles Recherches Biomédicales), GP was supported by a fellowship from NRB. WZ was supported by fellowships from INSERM and Région Ile de France (DIM Stem Pôle). MN is a Principal Investigator of IREC (Institut de Recherche Expérimentale & Clinique). The authors thank Olivier Trassard (IFR I2B, Hôpital de Bicêtre, France) for expert help with imaging.

AUTHOR DISCLOSURE STATEMENT

No competing financial interests exist.

REFERENCES

- 1 - Singer NG and AI Caplan. (2011). Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation. *Annu Rev Pathol* 6: 457-478.
- 2 - Crisan M, S Yap, L Casteilla, CW Chen, M Corselli, TS Park, G Andriolo, B Sun, B Zheng, L Zhang, C Norotte, PN Teng, J Traas, R Schugar, BM Deasy, S Badylak, HJ Buhring, JP Giacobino, L Lazzari, J Huard and B Péault. (2008). A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell* 3: 301-313.
- 3 - da Silva Meirelles L, PC Chagastelles, and NB Nardi. (2006). Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci* 119: 2204-2213.
- 4 - Gotherstrom C, O Ringden, M Westgren, C Tammik, and K Le Blanc. (2003). Immunomodulatory effects of human foetal liver-derived mesenchymal stem cells. *Bone Marrow Transplant* 32: 265-272.
- 5 - Guillot PV, C Gotherstrom, J Chan, H Kurata, and NM Fisk. (2007). Human first-trimester fetal MSC express pluripotency markers and grow faster and have longer telomeres than adult MSC. *Stem Cells* 25: 646-654.
- 6 - Wegmeyer H, AM Bröske, M Leddin, K Kuentzer, AK Nisslbeck, J Hupfeld, K Wiechmann, J Kuhlen, C von Schwerin, C Stein, S Knothe, J Funk, R Huss, M Neubauer. (2013) Mesenchymal stromal cell characteristics vary depending on their origin. *Stem Cells Dev.* 22:2606-18.
- 7 - Gotherstrom C, A West, J Liden, M Uzunel, R Lahesmaa, and K Le Blanc. (2005). Difference in gene expression between human fetal liver and adult bone marrow mesenchymal stem cells. *Haematologica* 90: 1017-1026.
- 8- Zhang W, Z Hamidouche, G Pourcher, V Gribova, F Haghighi, JJ Candelier, P Charbord* and A Dubart-Kupperschmitt.* (2014). A population of human mesenchymal stem cells specific to the fetal liver development. *J Stem Cell Res Ther* 4:10, 1-9 ; doi:10.4172/2157-7633.1000238 (open access journal)

- 9 - Najimi M, DN Khuu, PA Lysy, N Jazouli, J Abarca, C Sempoux, and EM Sokal. (2007). Adult-derived human liver mesenchymal-like cells as a potential progenitor reservoir of hepatocytes? *Cell transplantation* 16: 717-728.
- 10 - Nordlie RC, JD Foster, AJ and Lange. (1999). Regulation of glucose production by the liver. *Annual review of nutrition* 19: 379-406.
- 11 - Khuu DN, I Scheers, S Ehnert, N Jazouli, O Nyabi, P Buc-Calderon, A Meulemans, A Nussler, EM Sokal, and M Najimi. (2011). In vitro differentiated adult human liver progenitor cells display mature hepatic metabolic functions: a potential tool for in vitro pharmacotoxicological testing. *Cell transplantation* 20: 287-302.
- 12 - Zhao Q, H Ren, X Li, Z Chen, X Zhang, W Gong, Y Liu, T Pang, and ZC Han. (2009). Differentiation of human umbilical cord mesenchymal stromal cells into low immunogenic hepatocyte-like cells. *Cytotherapy* 11: 414-426.
- 13 - Stock P, S Bruckner, S Ebensing, M Hempel, MM Dollinger, and B Christ. (2010). The generation of hepatocytes from mesenchymal stem cells and engraftment into murine liver. *Nat Protoc* 5: 617-627.
- 14 - Campagnoli C, IA Roberts, S Kumar, PR Bennett, I Bellantuono and NM Fisk. (2001). Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood* 98: 2396-402.
- 15- Forbes SJ, S Gupta, A Dhawan. (2015). Cell therapy for liver disease: From liver transplantation to cell factory. *J Hepatol* 62(1 Suppl): S157-69.
- 16- Moreno R, I Martínez-González, M Rosal, M Nadal, J Petriz, E Gratacós, JM Aran. (2012). Fetal liver-derived mesenchymal stem cell engraftment after allogeneic in utero transplantation into rabbits. *Stem Cells Dev* 21(2): 284-95.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: FL-MSC characterization

A: Morphology of primary layers of adherent MSCs isolated from human fetal liver at low, medium and high confluence. Magnification: 100 x.

B: Cell surface markers expression profile in FL-MSCs. CD31, CD34, CD45, CD73, CD90, and CD146 markers were analyzed using flow cytometry. Immuno-positive Expression is shown as histograms (Red) and compared to corresponding control isotypes IgG (black). The flow cytometry histograms are representative of at least three cell populations isolated from different livers.

Figure 2: Expression of mesenchymal markers in FL-MSCs

Mesenchymal markers (vimentin and nestin), and smooth muscle markers (calponin, desmin, and α -SMA) immunostaining was evaluated using validated corresponding primary antibodies and by fluorescence microscopy. Images are representative of several fields examined from the four cell populations. Cell nuclei are stained using DAPI (blue). Negative control: secondary antibody alone. Magnification: 200 x

Figure 3: *in vitro* mesodermal differentiation of FL-MSCs.

(A, B): Adipogenic differentiation, Oil red O staining after 21 days of culture in adipogenic medium (B) or corresponding control cultures (A). Bar = 20 μ m. (C, F): Osteogenic differentiation, Alkaline phosphatase staining after 6 days of culture in osteogenic medium (D) or corresponding control cultures (C). Alizarin red staining after 21 days of culture in osteogenic medium (F) or corresponding control cultures (E). Bar = 50 μ m.

Figure 4: *in vitro* hepatocytic differentiation of FL-MSCs:

A) Morphological changes noticed in differentiated FL-MSCs after 3-4 weeks of culture in hepatogenic differentiation medium as compared to undifferentiated cells. Magnification: 100 x

B) RT-qPCR gene expression analysis demonstrated the decrease in stemness markers and the upregulation of hepatocyte markers mostly at the last maturation step of the differentiation process

which is in correlation with morphological changes. Results are expressed as fold change in differentiated versus undifferentiated FL-MSC. *ALB* (albumin encoding gene), *MRP2* (Multi-drug resistance-associated protein-2 encoding gene), *FOXA1* (Forkhead Box A1 encoding gene), *ACTA2* (α -SM-actin encoding gene), *CDH1* (cadherin-1 encoding gene), *CXCR4* (chemokine (C-X-C motif) receptor 4 encoding gene), *SOX9* (SRY-Related HMG-Box 9 encoding gene), *SOX17* (SRY-Related HMG-Box 17 encoding gene).

C) Immunoreactivity to human hepatic marker and transcription factor specific antibodies: α -fetoprotein (AFP), albumin, HNF (Hepatocyte Nuclear Factor) 3 β , HNF4 α , HNF6 and HNF1 α . Presented images are representative of at least 4 different experiments. Negative control: secondary antibody alone. Scale Magnification: 400 x (except for HNF1 α (all cells analyzed); Alb and HNF3 β in Huh-7: 200x).

Figure 5: *in vitro* functional hepatocytic differentiation of FL-MSCs

A) Undifferentiated and differentiated FL-MSCs were incubated with IPA substrate for 4 hours and luciferase activity was measured. Results are expressed the relative luminescence unit detected in the differentiated (D) cells versus undifferentiated (U) counterparts. Data shown are the mean \pm SEM of at least 4 independent experiments. Freshly isolated mouse hepatocytes (n=2) under the same experimental s for CYP3A4 activity evaluation, were used as positive controls

B) Dil-LDL uptake analysis was evaluated after 3h incubation. Fixed cells were checked using fluorescent microscope. Huh-7 cells were used as a positive control. Pictures were taken at magnification of 200x. The activity of glucose 6-phosphatase (G6Pase) was assessed using cytochemistry. Brown stained cells revealed their ability to convert glucose-6-phosphate substrate to glucose by active G6-Pase. Freshly isolated human hepatocytes were used as a positive control. If both cell groups were displaying Dil-LDL uptake and G6-Pase activity, differentiated FL-MSCs showed more consistent functionalities. All images are representative of 3 different experiments. Magnification: 200 x.

C) Indocyanine green uptake and release. **Huh-7 cells were used as a positive control.** Data shown are representative of 4 different experiments. Magnification: 200 x

Figure 6: Engraftment and in situ differentiation of FL-MSCs in intra-hepatically transplanted NOD/SCID mice.

OTC (Ornithine transcarbamylase, Upper panel) and human Albumin (Lower panel) immunohistochemistry in liver sections from NOD/SCID mice intrahepatically infused with undifferentiated or differentiated FL-MSCs. Analyses were performed at 8 weeks post-transplantation and **revealed the presence of both integrated scattered cells and clusters of cells expressing both human albumin and OTC, mainly close to vascular structures.** Negative control: PBS-injected mice. Magnification 400 x.

Table 1: Antibodies used in this study

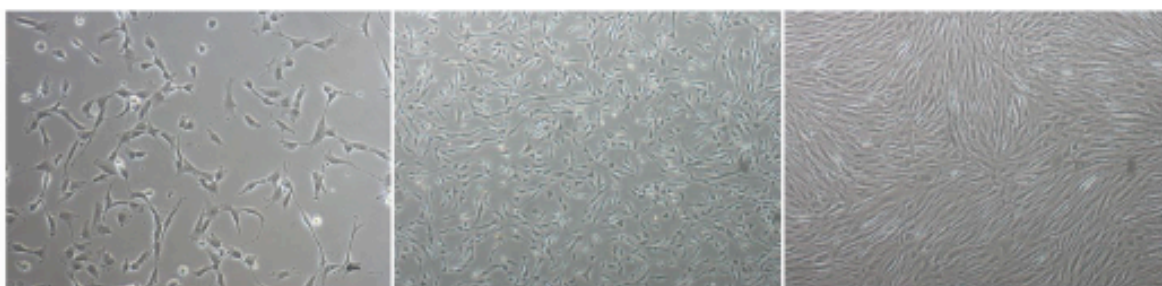
Antibodies/ technique used	Supplier	Reference number
Primary		
<i>FACS</i>		
CD31	Beckman coulter	IM2409
CD34	Beckman coulter	A07776
CD45	Beckman coulter	A07783
CD73	BD pharmingen	550257
CD146	Biocytex	5050-F100T
<i>Immunofluorescence</i>		
Vimentin	Sigma	V5255
Calponin	Sigma	C2687
α -SMA	Sigma	C6198
Nestin	Abcys	VMA5326
Desmin	Sigma	D1033
HNF6	Santa Cruz	sc-13050
HNF4 α	Santa Cruz	SC-8987
HNF3 β	Santa Cruz	sc-6554
HNF1 α	Santa Cruz	sc-135939
α -foetoprotein	Santa Cruz	SC-8399
Albumin	Cedarlane	CL2513A
<i>Immunohistochemistry</i>		
Albumin	Calbiochem	126584
OTC	Sigma	HPA000243
Secondary		
Donkey anti-rabbit Alexa Fluor® 488	Invitrogen	A21206
Donkey anti-rabbit Alexa Fluor® 568	Invitrogen	A10042
Donkey anti-goat Alexa Fluor® 488	Invitrogen	A11055
Donkey anti-mouse Alexa Fluor® 488	Invitrogen	A21202
Donkey anti-mouse Alexa Fluor® 568	Invitrogen	A10037
Anti-rabbit (HRP)	Dako	K4003

Table 2: Primers used for FL-MSC mRNA analysis

Gene name	Reference
<i>ALB</i>	Hs00910225_m1
<i>MRP2</i>	Hs00166123_m1
<i>FOXA1</i>	Hs00270129_m1
<i>ACTA2</i>	Hs00909449_m1
<i>CDH1</i>	Hs01023894_m1
<i>CXCR4</i>	Hs00607978_s1
<i>SOX9</i>	Hs00165814_m1
<i>SOX17</i>	Hs00751752_s1

Figure 1

A



B

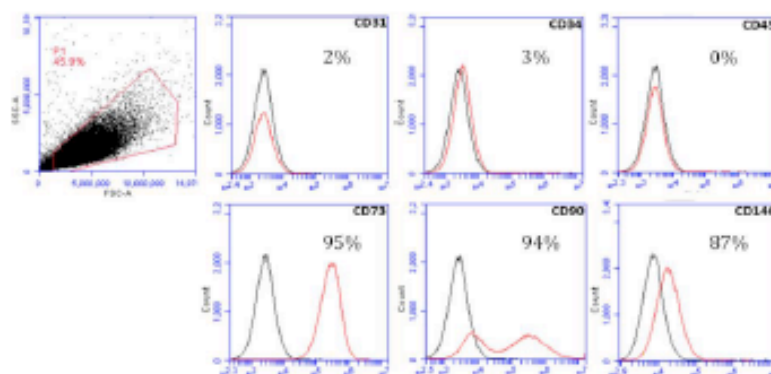


Figure 2:

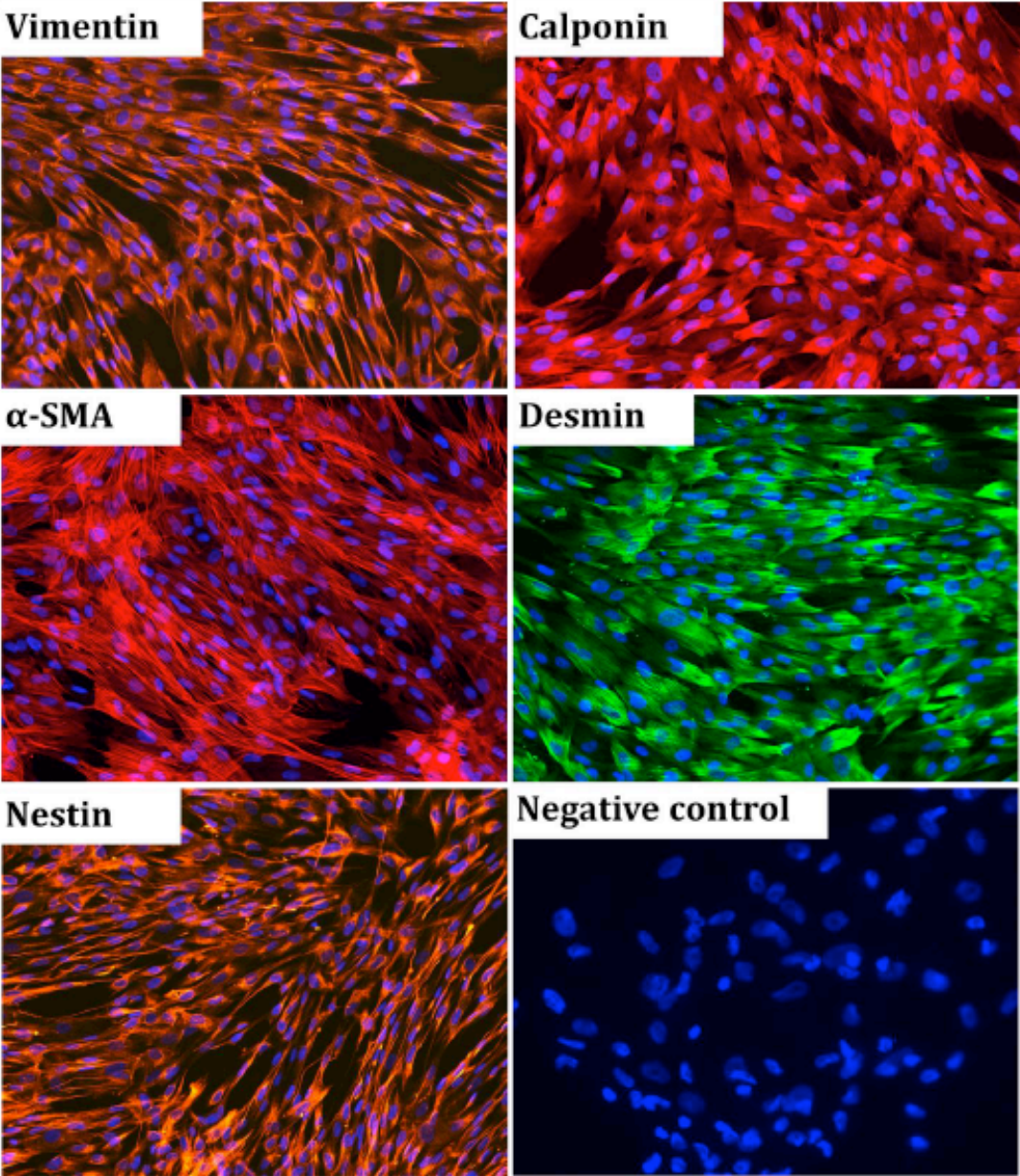


Figure 3:

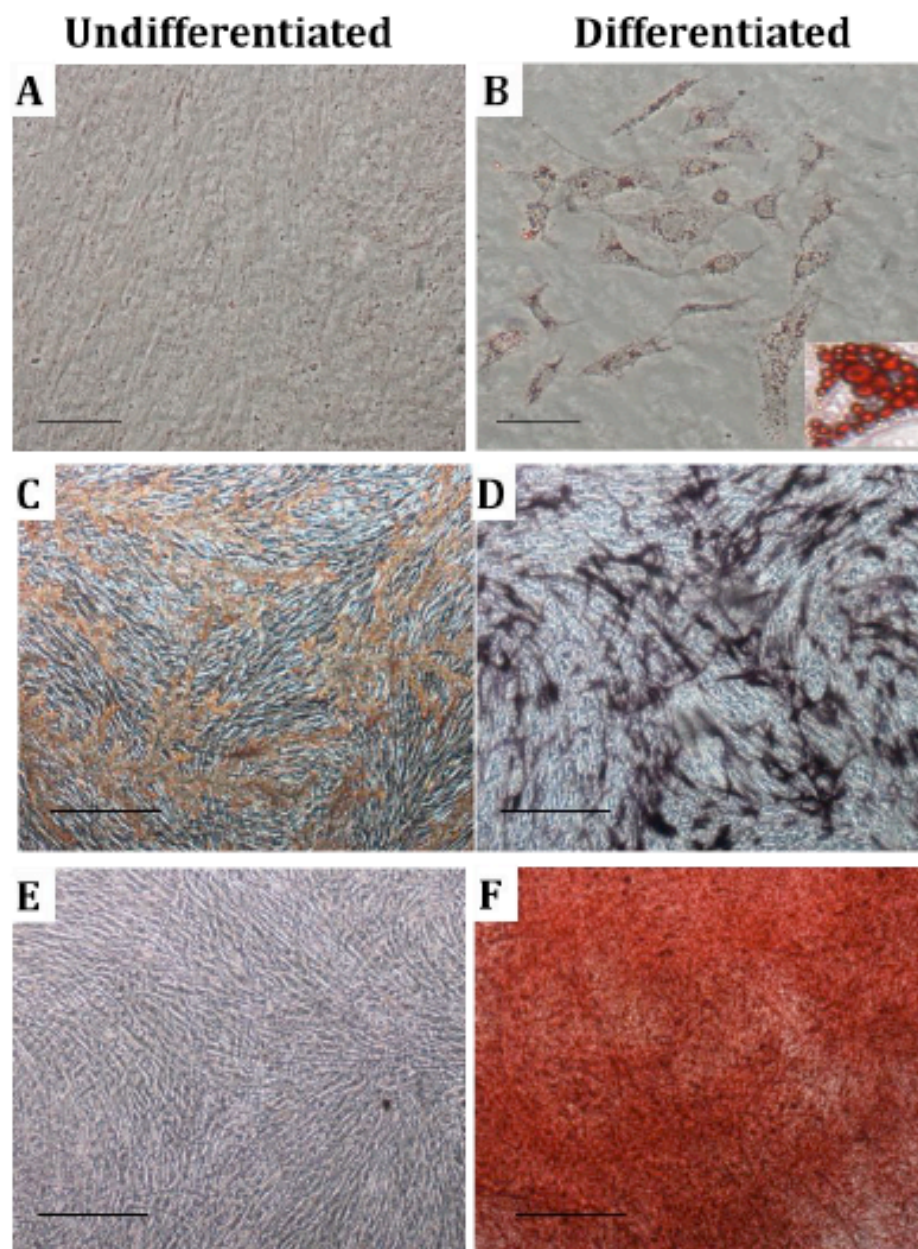


Figure 4:

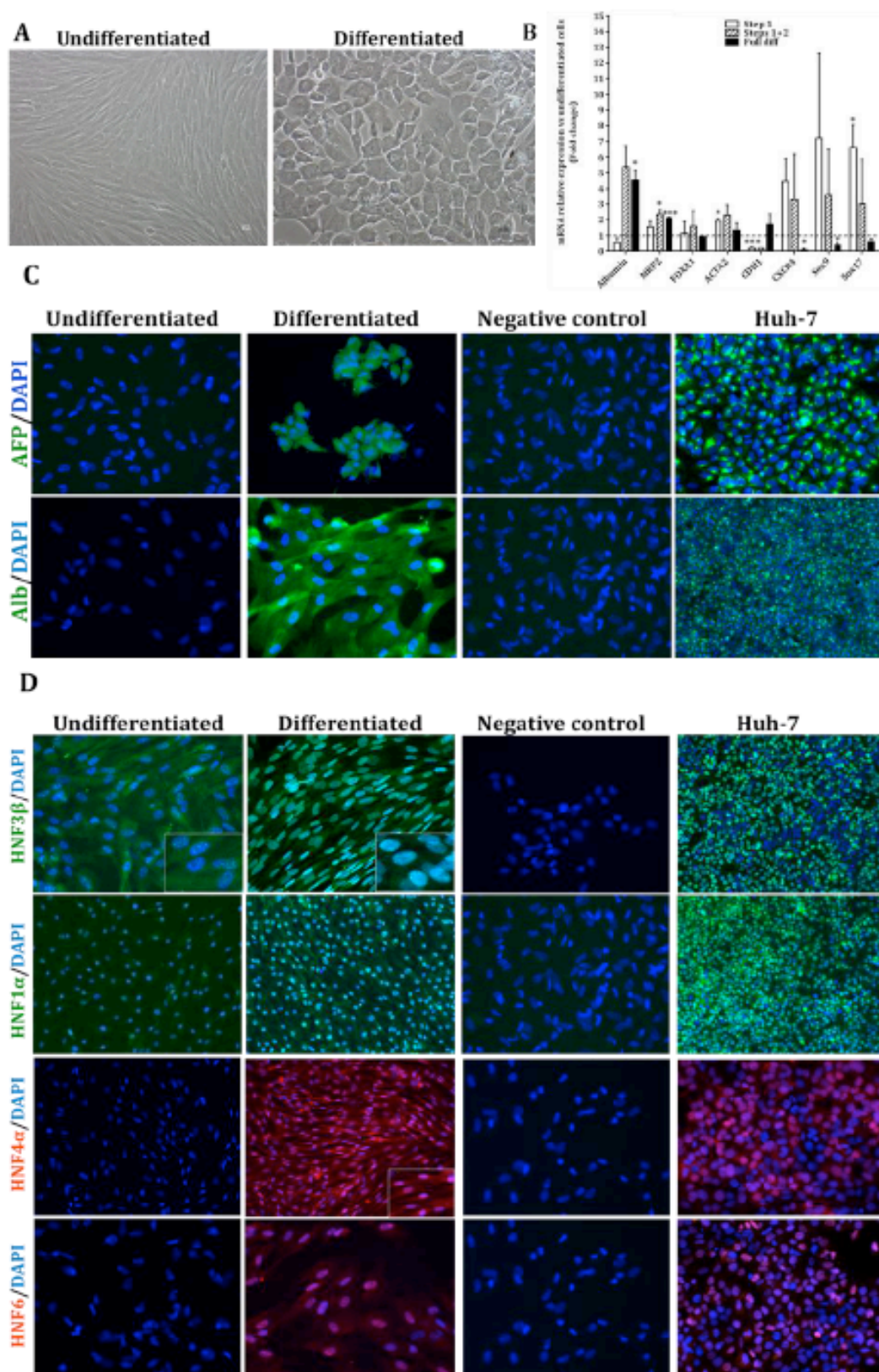


Figure 5:

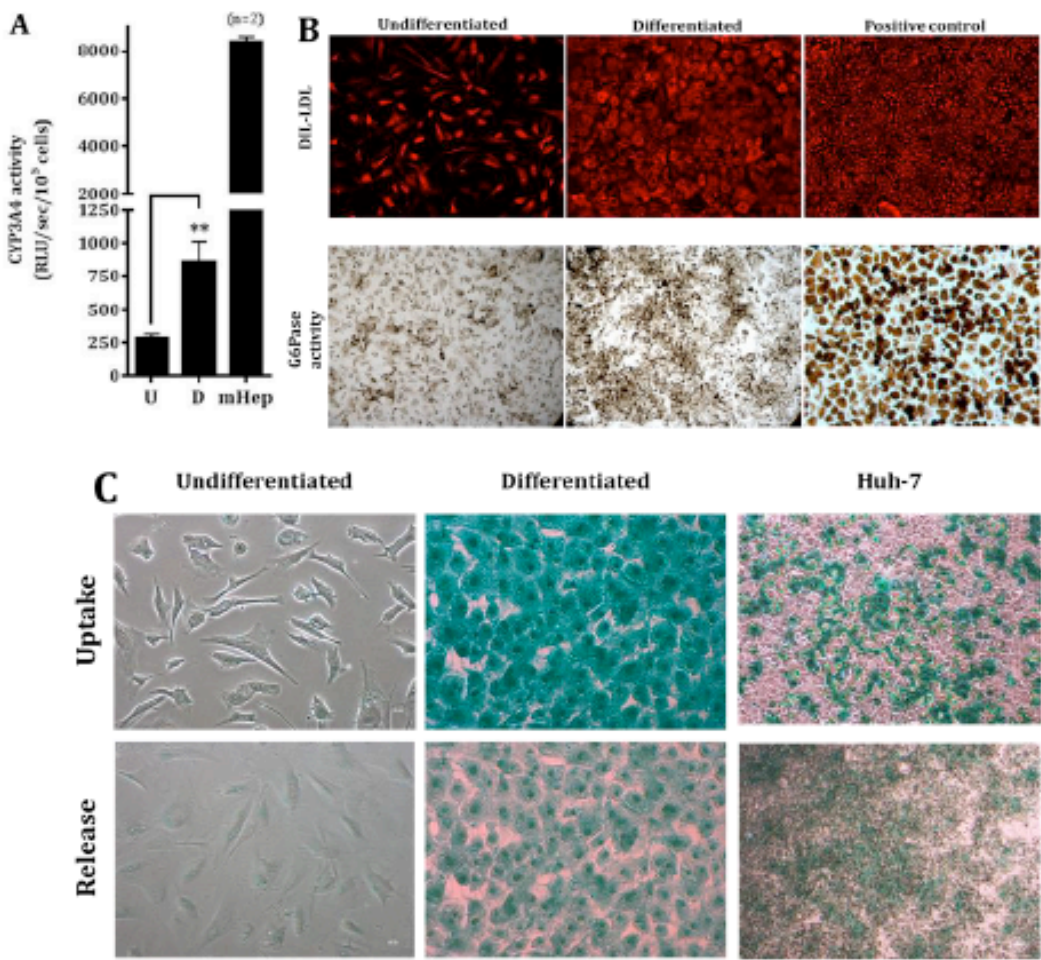
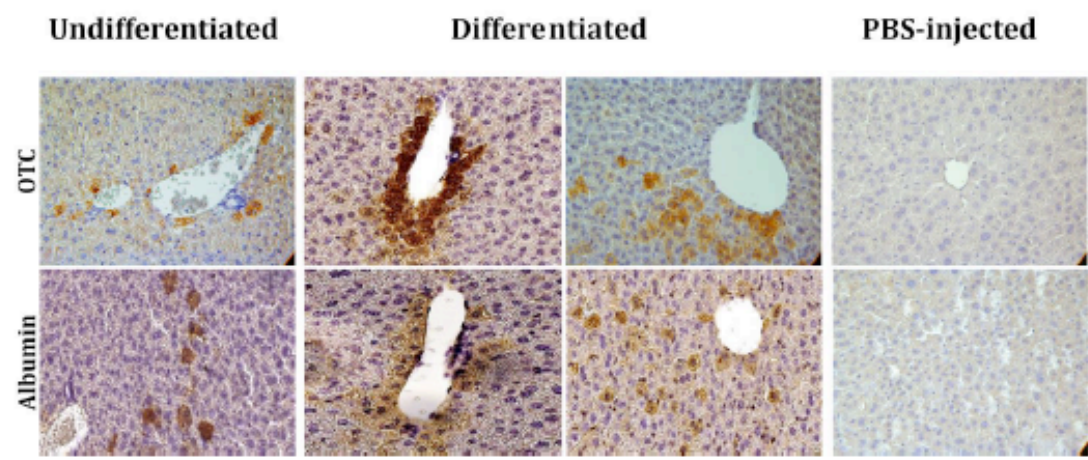


Figure 6:



Conclusion 2 :

Dans ce travail, nous avons démontré la capacité des FL-CSM à se différencier en cellules *hepatocyte-like in vitro*. Ces FL-CSM sous condition de culture particulière perdent leur morphologie fibroblastique et adoptent une morphologie épithéliale. Ces dernières expriment des marqueurs hépatoblastiques/hépatocytaires et présentent certaines fonctionnalités hépatocytaires *in vitro*. Après transplantation aux souris immunodéficientes nouveau-nées, les FL-CSM natives et différenciées sont @capables d'intégrer le parenchyme hépatique, de maturer ou de s'y différencier et d'y maturer *in situ*. Nos données laissent penser que les FL-CSM pourraient être de bonnes candidates pour des essais précliniques *in vivo*.

4.3. AUTRES TRAVAUX

- C. Nelro, A. Lebrun, K. Lamouri, **G. Pourcher**, C. Voican, M. Njike-nguefang, S. Ferretti, R. Courie, H. Tranchart, A. Balian, S. Prevot, G. Perlemuter, I. Dagher, S. Naveau. *Changes in liver stiffness after bariatric surgery in patients with suspected non-alcoholic fatty liver disease and factors explaining these changes*. **Plose One**, soumis 2015
- **G. Pourcher**, S. Ferretti, W. Akakpo, P. Lainas, H. Tranchart, I. Dagher. *Single-port sleeve gastrectomy for super obese patients*. **Surgery Obesity Related Diseases** 2015, accepté dec 2015
- **G Pourcher**, H. El Kehdy, S. Goulinet-Mainot, M. Najimi, P. Charbord, A. Dubart-Kupperschmitt. *Hepatocytic differentiation potential of human FL-MSc: in vivo and in vitro evaluation*. **Stem Cell International** 2015, accepté dec 2015
- **G. Pourcher**, H. EL-Kehdy, F. Kanso, MT. Picard , M. gaillard, O. Trassard , I. Blazsek, A. Dubart-Kupperschmitt, I. Dagher. *Volumetric portal embolization: a*

new concept to improve liver regeneration and engraftment of hepatocytes.

Transplantation 2015 accepté sept 2015, TPA-2015-0340

- A. Damouche, T. Lazure, N. Huot, N. Dejucq-Rainsford, V. Avettand-Fénoël, A. Satie, A. Mélard, L. David, C. Gomet, J. Ghosn, N. Noel, **G. Pourcher**, V. Martinez, S. Benoist, V. Beréziat, A. Cosma, B. Favier, B. Vaslin, C. Rouzioux, J. Capeau, M. Müller-Trutwin, N. Dereuddre-Bosquet, R. Le Grand, O. Lambotte and C. Bourgeois. *Adipose tissue is a neglected viral reservoir and an inflammatory site during chronic HIV and SIV infection.* **PloS Pathogens**, 2015 vol. 11(9) : 10051-53

- Ferron G, Simon L, Guyon F, Glehen O, Goere D, Elias D, Pocard M, Gladieff L, Bereder JM, Brigand C, Classe JM, Guilloit JM, Quenet F, Abboud K, Arvieux C, Bibeau F, De Chaisemartin C, Delroeux D, Durand-Fontanier S, Goasguen N, Gouthi L, Heyd B, Kianmanesh R, Leblanc E, Loi V, Lorimier G, Marchal F, Mariani P, Mariette C, Meeus P, Msika S, Ortega-Deballon P, Paineau J, Pezet D, Piessen G, Pirro N, Pomel C, Porcheron J, **Pourcher G**, Rat P, Regimbeau JM, Sabbagh C, Thibaudeau E, Torrent JJ, Tougeron D, Tuech JJ, Zinzindohoue F, Lundberg P, Herin F, Villeneuve L; BIG-RENAPE Working Group. *Professional risks when carrying out cytoreductive surgery for peritoneal malignancy with hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC): A French multicentric survey.* **Eur J Surg Oncol**. 2015 Vol. 41(10) : 1361-7

- GP. De Filippo, **G. Pourcher**, P. Bougneres. *A surgical approach of severe obesity in adolescents.* **Archive de Pédiatrie** 2015 Jul; 22(7): 682-4.

- **G. Pourcher**, D. Costagliola, Martinez V. *Obesity in HIV-infected patients in France: prevalence and surgical procedures.* **Journal of visceral surgery** 2015 Feb; 152(1):33-7

- **G. Pourcher**, GP De Filippo, S. Ferretti, C. Piquard, I. Dagher, P. Bougneres. *Singles port sleeve gastrectomy in adolescents with severe obesity.* **Surgery Obesity Related Diseases** 2015 Jan-Feb; 11(1): 65-9

- Donatelli G, Dumont JL, Cereatti F, Ferretti S, Vergeau BM, Tuszyński T, **Pourcher G**, Tranchart H, Mariani P, Meduri A, Catheline JM, Dagher I, Fiocca F, Marmuse JP, Meduri B. *Treatment of Leaks Following Sleeve Gastrectomy by Endoscopic Internal Drainage (EID. 2)*. **Obesity Surgery**, 2015 Jul; 25(7):1293-301.
- W. Zhang, Z. Hamidouche, **G Pourcher**, et al. *A population of human mesenchymal stem cells specific to the fetal liver development*. **Stem cells Research Therapy**, 2014 vol 4: 10-19
- G. Donatelli, S.Ferretti, B.Vergeau, P. Dhumane, JL Dumont, S Derhy, T Tuszyński, S Dritsas, A Carloni, JM Catheline, **G. Pourcher**, I. Dagher, B. Meduri. *Endoscopic internal Drainage with Enteral Nutrition (EDEN) for treatment of leaks following sleeve gastrectomy*. **Obesity Surgery** 2014 Aug; 24(8):1400-7
- Naveau S, Lamouri K, **Pourcher G**, Njiké-Nakseu M, Ferretti S, Courie R, Tranchart H, Ghinoiu M, Balian A, Prévot S, Perlemuter G, Dagher I. *The Diagnostic Accuracy of Transient Elastography for the Diagnosis of Liver Fibrosis in Bariatric Surgery Candidates with Suspected NAFLD*. **Obesity Surgery** 2014 Oct; 24(10):1693-701.
- Tzanis D, Lainas P, Tranchart H, **Pourcher G**, Devaquet N, Perlemuter G, Naveau S, Dagher I. *Atypical as well as anatomical liver résections are feasible by laparoendoscopic single-incision surgery*. **International Journal of Surgery Case Report** 2014 ; 5(9) : 580-3
- Tranchart H, Lainas P, Tzanis D, Ferretti S, **Pourcher G**, Devaquet N, Dagher I. *Single incision laparoscopic splenectomy with hilar dissection for massive splenomegaly (with video)*. **Journal of visceral surgery** 2014 Apr;151(2):153-4
- H. Tranchart, S. Ketoff, P. Lainas, **G. Pourcher**, E. Giradi, D. Tzanis, S. Ferretti, A. Dautruche, N. Devaquet, I. Dagher. *Single incision laparoscopic cholecystectomy : for what benefit*.

HPB (Oxford) 2013 Jun; 15(6): 433-8.

- L. Senovilla, I. Vitale, I. Martins, M. Tailler, C. Pailleret, M. Michaud, L. Galluzzi, S. Adjemian, O. Kepp, M. Niso-Santano, S. Shen, G. Mariño, A. Criollo, A. Boilève, B. Job, S. Ladoire, F. Ghiringhelli, A. Sistigu, T. Yamazaki, S. Rello-Varona, C. Locher, V. Poirier-Colame, M. Talbot, A. Valent, F. Berardinelli, A. Antoccia, F. Ciccocanti, GM. Fimia, M. Piacentini, A. Fueyo, NL. Messina, M. Li, CJ. Chan, V. Sigl, **G. Pourcher**, V. Lazar, J. Penninger, C. López-Otín, MJ. Smyth, L. Zitvogel, M. Castedo and G. Kroemer.
An immunosurveillance mechanism controls cancer cell ploidy.
Science 2013 sep 28 ; 337(6102) :1678-84

- H. Tranchart, G. Di Giuro, P. Lainas, **G. Pourcher**, N. Devaquet, G. Perlemuter, D. Franco, I. Dagher. *Laparoscopic liver resections with selective prior Vascular control.* **Am J. Surg**, 2013 jan; 205 (1): 8-14

- **G. Pourcher**, G. Di Giuro, T. Lafosse, P. Lainas, S. Naveau, I. Dagher. *Routinely performed single-port sleeve gastrectomy: a single-center study of 60 patients.* **Surgery Obesity Related Diseases**, 2013 May-Jun; 9(3): 385-9

- **G. Pourcher**, C. Mazurier, Y. Y. King, M.C. Giarratana, L. Kobari, D.Boehm, L. Douay and H. Lapillonne. *Human fetal liver: an in vitro model of erythropoiesis.* **Stem Cells International**, 2011 vol. 2011: 405-429

- Tranchart H, Diop P. S, Lainas P, **Pourcher G**, Catherine L, Franco D, Dagher I. *Laparoscopic major hepatectomy can be safely performed with colorectal surgery for synchronous colorectal liver metastasis.* **HPB (Oxford)** 2011; 13: 46-50.

- Thubert T, **Pourcher G**, Deffieux X. *Small bowel volvulus following peritoneal closure using absorbable knotless device during laparoscopic sacral colpopexy.* **Int Urogynecol J.** 2011 Jun;22(6):761-3. Epub 2011 Jan 6.

5. DISCUSSION

Il a été démontré que la transplantation d'hépatocytes peut permettre de rétablir certaines activités métaboliques [171]. Le développement clinique de cette approche thérapeutique reste limité par divers facteurs critiques tels que la pénurie grandissante des dons d'organes, la qualité des hépatocytes isolés à partir des foies nonéligibles pour la greffe, et des caractéristiques des hépatocytes primaires (absence de potentiel prolifératif *in vitro*, dédifférenciation rapide après mise en culture et faible résistance aux processus de congélation/décongélation) [233, 443-447]. D'autres facteurs plus « mécaniques » comme la quantité de cellules greffées, le rapport bénéfice-risque de la préparation du foie receveur ou même le site d'injection des cellules à greffer restent mal définis et les essais cliniques sont largement freinés par la pénurie de cellules.

Pour ce qui est de la partie cellulaire, les recherches sont par conséquent dirigées vers le développement de sources cellulaires alternatives pouvant se substituer aux hépatocytes isolés. Le potentiel de prolifération et de différenciation des cellules souches (embryonnaires et adultes) a motivé les investigations visant à vérifier la capacité de ces cellules pour leur utilisation en thérapie cellulaire du foie. Plusieurs équipes, dont la nôtre, évaluent le potentiel des cellules souches pluripotentes (hESC et hiPSC) à se différencier en cellules *hepatocyte-like* fonctionnelles [259, 271, 273, 448]. Ces cellules permettant la survie de souris en insuffisance hépatique aiguë [449]. L'utilisation de ces cellules soulève des problèmes éthiques surtout pour les hESC. De plus, le pourcentage de cellules différenciées reste relativement faible et il en résulte une culture hétérogène de cellules (ESC non différenciées, ESC partiellement différenciées et d'autres types cellulaires). Pour contourner ce problème, une technique de tri par FACS des progéniteurs hépatiques a été développée par notre équipe [448]. Les cellules souches pluripotentes induites (hiPSC) pourraient contourner les problèmes éthiques rencontrés avec les hESC. Cependant, l'utilisation de ces cellules soulève beaucoup de questions. En

premier lieu, l'état de reprogrammation des cellules qui pourrait être incomplète, induisant ainsi la formation de tératomes ou d'autres types de tumeurs après transplantation [280] même si aujourd'hui des techniques de détection existent. Il est donc important et séduisant d'explorer des solutions alternatives n'obligeant pas à passer par un stade de reprogrammation intégral qui rallonge le processus et qui est difficile à contrôler. Ainsi, il paraît intéressant de contourner l'étape iPSC en essayant de générer des cellules *hepatocyte-like* directement à partir de cellules somatiques comme les fibroblastes ou d'autres types cellulaires.

Récemment, après que la preuve de concept ait été apportée chez la souris, deux équipes ont pu reprogrammer des fibroblastes humains en hiHep (*hepatocyte-like* induit humain) [325, 326]. Les 2 publications montrent que les hépatocytes primaires et les hiHep générés ont le même profil d'expression génique. Cependant, les hiHep, ne sont pas identiques aux hépatocytes primaires car il existe un certain nombre de gènes exprimés d'une manière différente dans les 2 types cellulaires. Les cellules générées artificiellement sont susceptibles de présenter des caractéristiques spécifiques imposées par les conditions de culture *in vitro* reproduisant ainsi en partie la complexité naturelle du microenvironnement hépatique.

Dans les deux études, les hiHep étaient validés dans 3 différents modèles murins d'insuffisance hépatique aigüe. Cependant, les 2 études montrent que les hépatocytes primaires restent nettement plus efficaces que les hiHep au regard du pourcentage d'intégration et de la sécrétion d'albumine dans le sérum. La preuve du concept est ainsi faite mais il reste à confirmer la faisabilité de la reprogrammation sur des cellules humaines adultes de patients atteints de maladies métaboliques. Nous avons donc choisi pour ce travail d'utiliser des cellules MSC souche de foie fœtal car les cellules souches adultes présentent peu de risque et de problème éthique (en fonction de leur origine tissulaire). Ces dernières ont été isolées aussi bien au niveau intra et extra-hépatique [450-454]. Comme pour le foie adulte, notre équipe a isolé une population de cellules MSC à partir de foies fœtaux humains (FL-CSM). Il a été rapporté qu'en

fonction de l'origine tissulaire des MSC, elles disposent d'un certain pré-engagement pour se différencier vers une voie déterminée [316, 455-457]. Les FL-CSM expriment certains facteurs de transcription hépatiques. Ces dernières sont en rapport étroit avec les hépatocytes fœtaux et partagent la même niche. Nous avons émis l'hypothèse que les FL-CSM pourraient présenter un avantage pour la thérapie cellulaire des maladies du foie par rapport à leurs homologues d'origine différente. Ainsi la partie cellulaire de ce travail a concerné l'évaluation du potentiel de ces FL-CSM à se différencier en cellules hépatocytaires aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*.

La soumission des FL-CSM à un protocole de différenciation hépatogénique pendant 4 semaines induit un changement morphologique significatif des cellules. Elles se différencient et perdent leur aspect fibroblastique pour adopter une morphologie polygonale avec une apparence épithéliale. En plus du changement morphologique, nous avons également montré les changements phénotypiques des FL-CSM différenciées qui acquièrent des marqueurs hépatoblastiques/hépatocytaires tels que les facteurs de transcription HNF4 α et HNF6 ainsi que l' α -fetoprotéine et l'albumine. Nous avons par la suite évalué la capacité fonctionnelle des cellules différenciées en analysant *in vitro* certaines activités métaboliques. En effet, nous avons démontré que ces FL-CSM différenciées présentent une activité significative du cytochrome CYP3A4 et de la glucose-6-phosphatase, en comparaison avec les cellules non différenciées. Nous avons aussi démontré leurs capacités d'internalisation et de relargage de l'ICG, d'internalisation du DIL-LDL et du stockage du glycogène.

Par la suite, nous avons étudié le comportement des FL-CSM *in vivo* après transplantation dans des souris immunodéficientes (dans un foie en cours de développement à un stade ontologique précoce). Huit semaines après transplantation, la présence de cellules humaines dans le parenchyme hépatique ainsi qu'autour des espaces péri-portaux a été mise en évidence. Ces cellules humaines retrouvées exprimaient les marqueurs hépatocytaires matures tels que

l'albumine et l'ornithine transcarbamylase avec une morphologie épithéliale suggérant leur intégration dans le parenchyme hôte [458].

Nos résultats confirment donc le potentiel d'implantation des FL-CSM transplantées et leur capacité à se différencier *in situ*. Nous avons remarqué que le taux des cellules implantées était meilleur dans le groupe des souris transplantées avec des FL-CSM pré-différenciées *in vitro*. Des MSC du tissu adipeux ont été étudiées en terme de potentiel de différenciation et de fonctionnalité *in vitro* et *in vivo* [459]. Ces dernières semblent prometteuses. Cependant, le protocole de différenciation contient des agents modificateurs de la chromatine qui pourraient induire des cancers. Ce protocole pose donc des problèmes de sécurité. A l'heure actuelle, les cellules mésenchymateuses du foie adulte (ADHLC) sont les cellules souches adultes les plus étudiées *in vitro* et *in vivo* mais aussi en clinique. Il faut noter que les capacités de différenciation diminuent avec l'âge [439] ce qui donne un avantage certain aux cellules du foie fœtal. Les études menées sur les cellules *hepatocyte-like* générées à partir des différents types de MSC ne sont pas au même stade d'investigation et sont difficiles à comparer. Définir la cellule souche la plus intéressante pour la thérapie cellulaire reste très difficile.

Le maintien durable de l'effet post-transplantation est le paramètre essentiel et doit être amélioré pour un meilleur développement de la transplantation d'hépatocytes. La quantité de cellules initialement injectées puis implantées influence significativement ce paramètre [171, 460]. De nombreux modèles animaux ont été développés afin de permettre une meilleure incorporation des cellules injectées dans le parenchyme du receveur. Cependant, l'extrapolation de ces protocoles chez l'homme reste extrêmement limitée du fait de risques importants.

Ainsi le deuxième objectif de mon travail était d'élaborer un protocole peu invasif, potentiellement transposable en clinique, de préparation du foie à la greffe d'hépatocytes. Ce protocole repose sur le principe d'embolisation portale partielle mais avec un nouveau concept, celui de **l'embolisation volumétrique** comme nous l'avons longuement discuté. Les objectifs

sont, comme l'embolisation portale, de déclencher un signal régénératif du foie receveur et d'obtenir un « espace physiologique » pour les cellules greffées mais cette embolisation portale partielle anatomique pose le problème de la restriction du territoire de répartition hépatique avec des problèmes d'hypertension portale limitant le nombre d'hépatocytes. Ainsi avec l'embolisation portale volumétrique c'est-à-dire distale dans l'ensemble du volume hépatique, on obtient l'amélioration du nombre de cellules injectées pour maximiser l'efficacité de la transplantation et la prise de greffe [425]. Pour cela, nous avons émis l'hypothèse que l'embolisation portale volumétrique juste en amont des sinusoides hépatiques plutôt que d'une branche de la veine porte (à l'aide de microsphères en polystyrène), pourrait induire un signal régénératif optimisant la prise de greffe dans l'intégralité du foie tout en préservant au maximum l'anatomie des vaisseaux portes proximaux.

En premier lieu, nous avons défini les conditions optimales en termes de calibre, de concentration, de vitesse d'injection et de viscosité des microsphères utilisées pour induire l'embolisation distale avec une obstruction présinusoidale plutôt que dans les branches de la veine porte, sans diffusion pulmonaire. Le but recherché est d'avoir une répartition homogène des microsphères dans tous les segments du foie. Nous avons réalisé ces mises au point sur modèle murin, des souris C57BL6, car un grand nombre d'animaux et d'euthanasies sont nécessaires pour faire la preuve du concept. Le modèle de souris était donc le plus facile et le plus accessible pour établir la preuve du principe. Bien sûr, étant donné les limites de ce modèle et sur la base des résultats actuels, nous voulons passer à un modèle animal plus gros, comme le porc, pour l'avenir. Dans le cadre de ce modèle de petit animal, les microsphères étaient en polyesther inerte pour éviter au maximum les phénomènes inflammatoires ce qui pourrait intervenir dans les échecs de la greffe [180, 461]. Ainsi, nous avons testé des microsphères allant de 10 à 200 μm de diamètre, ce qui correspond aux variations de diamètre des vaisseaux hépatiques présinusoidaux [462, 463]. Le volume de suspension des sphères a été limitée à 0,6

ml parce que le volume de sang circulant de souris adultes C57BL6 est d'environ 1,5 ml [160, 464]. Pour ce qui est des aiguilles de ponction portale deux calibres (27G et 29G) ont été utilisés car très rapidement pour les billes les plus grosses et les forte concentration de sphères, une obstruction de la tubulure apparaît, mais plus l'aiguille est grosse plus le risque hémorragique due à la perforation portale est important surtout chez la souris. Nous avons ensuite vérifié la répartition homogène des microsphères dans le foie totale par l'analyse histologique de tous les lobes mais également par une analyse vasculaire angiographique [425]. Les souris sont alors sacrifiées 2 jours plus tard. Il a été en effet démontré dans plusieurs modèles animaux que le pic de régénération après hépatectomie ou embolisation était précoce [465, 466]. Ce pic de régénération est mis en évidence par l'analyse de l'expression de l'antigène Ki67 dans le foie par la technique d'immunohistochimie, marqueur nucléaire positif des cellules en division largement utilisé. Le pic de Ki67 est à 48 heures dans le modèle de la souris [465, 466]. Le taux de Ki67 après EPV était à la fois en corrélation positive avec le nombre de microsphères utilisées pour l'embolisation et en corrélation négative avec le diamètre des microsphères. Toutefois, ces constatations nécessitent une confirmation dans d'autres modèles animaux avec des calibres de veine porte plus grands, ce qui permettrait d'analyser l'effet des billes plus grosses en utilisant des aiguilles de ponction plus grosses. Néanmoins, le diamètre des vaisseaux sinusoides est similaire chez la souris et chez l'homme [462, 463] C57BL6. Plusieurs étapes ont été nécessaires car nous avons constaté qu'une injection de moins de 4 millions de microsphères n'était pas suffisante pour emboliser un nombre suffisant de sinusoides et par conséquent enclencher un signal de régénération. Très rapidement en début d'expérimentation dès que le nombre de microsphères injectées est augmenté, elles s'agglutinent entre elles et passent par salve provoquant ainsi une embolisation anatomique classique (sectorielle) replissant les sinusoides (billes de 10 μ m), responsable de la formation de plages nécrotiques ischémiques macroscopiques et histologiques par probable embolisation trop

distale (anastomose artérioveineuse) sur tout un territoire. Pour optimiser la répartition des microsphères, nous les avons mises en suspension dans une solution dense, de Voluven® (hydroxyéthylamidon), solution utilisée en clinique pour le remplissage macromoléculaire, dans le but de maintenir en suspension les billes afin qu'elles puissent atteindre les veines présinusoïdales plus facilement après injection. Ainsi, nous sommes parvenus à augmenter le nombre de microsphères injectées sans nécrose avec une répartition homogène. Mais, cela n'a pas toujours été suffisant pour induire une régénération hépatique et seul des quantités importantes permettent de déclencher le signal de façon proportionnelle. Malheureusement dès que l'on injecte plus de 8 millions de microsphères de 10 μm la nécrose n'est pas évitable, probablement à cause de l'obstruction complète sinusoïdale et des veines segmentaires portales sur un grand territoire. Ainsi le pourcentage de nécrose du tissu hépatique est corrélé avec la quantité de microsphères de 10 μm injectées [425]. La présence de plages de nécrose est associée à un taux élevé de mortalité chez les souris embolisés, probablement causé par une importante ($> 80\%$) obstruction des vaisseaux sinusoïdes, conduisant à une insuffisance hépatique aiguë [390]. Malheureusement en augmentant le calibre des microsphères injectées à $>30 \mu\text{m}$ pour éviter de passer l'anastomose artério-veineuse sinusoïdale, nous avons constaté une agglutination des billes dans la tubulure par blocage lié au calibre de l'aiguille 29G (325 μm \varnothing). Aussi, à cause de la petite taille de la veine porte chez la souris, des aiguilles plus grosses (27G) sont directement en relation avec des hémorragies portales importantes. Ce qui correspond clairement aux limites du modèle murin pour évaluer véritablement ce nouveau concepte volumétric.

Par ailleurs, pour la meilleure condition dans le modèle de souris C57Bl6 [425], une évaluation à long terme a été effectué chez 3 souris qui ont été maintenus en vie jusqu'à 21 jours sans aucune complication ou autre anomalie macroscopique et microscopique. Par contre une cytolyse biologique modérée (4 à 5 fois le groupe témoin) a été observée à 48h avec une

persistance à J21 (2 fois le témoin). Ces anomalies biologiques minimales étant très bien connues en clinique après embolisation portale [403, 467].

Pour ce qui est de l'amélioration de la régénération, on obtient après hépatectomie 19,5% de KI67 à 48h dans les 30% restant du foie, ce qui est peu différent de 5% de Ki67 + dans 100% du foie en termes de nombre total d'hépatocytes en régénération. Ainsi, un signal de régénération équivalent à celui déclenchée par une hépatectomie de 70% est produit par EPV, mais il est réparti dans tout le volume du foie disponible pour la transplantation.

Par ailleurs, afin de visualiser la répartition objective des microsphères injectées à J0 et J5 (la prise de greffe d'hépatocytes est évaluée à J5), nous avons utilisé un protocole d'injection d'alginate coloré qui polymérise au contact du calcium pour réaliser des angiographies portale et systémique. À J0, les microsphères semblent s'agglutiner dans les branches sectorielles pour mieux se répartir en distalité à J5 (Figures 4A et 5A article Transplantation), leur répartition dans les branches distales est bien nette et correspond aux territoires embolisés.

Nous avons observé chez les souris embolisées et transplantées (1 million d'hépatocytes syngéniques adultes isolés), que les hépatocytes transplantés s'intègrent dans le parenchyme hépatique et prolifèrent autour des microsphères. Les hépatocytes greffés dans le foie ont été analysés 5 jours après injection splénique pour optimiser le flux portal et éviter une nouvelle ponction de la veine porte après l'embolisation. Ce délai est important car d'une part l'intégration des hépatocytes dans le parenchyme hépatique nécessite jusqu'à 5 jours [171] et d'autre part, nous ne pouvions pas retarder cette analyse car le Hoechst utilisé comme marqueur cellulaire baisse après J5 et devient peu fiable en raison de la division cellulaire par diffusion du signal [468, 469]. Par ailleurs, grâce à un double marquage des hépatocytes au Hoechst et au DIR, qui est un intercalant membranaire émettant un signal fluorescent capté par une caméra *in vivo*, le cheminement des hépatocytes « *en direct* » a pu être réalisé depuis le point

d'injection des cellules jusqu'au foie [470]. Les hépatocytes marqués mettent 30 secondes pour passer de leur point d'injection, la rate, vers le foie. Les analyses *in vivo* du signal émis par les cellules transplantées montrent qu'à J5 le signal est 2 à 3 fois plus important chez les souris ayant subi une EPV préalable à la transplantation que pour les souris témoins. Afin de confirmer ces résultats et pour s'assurer que les hépatocytes transplantés n'ont pas migré vers d'autres organes, nous avons sacrifié les souris et mesurer la fluorescence émise par le foie, la rate et les poumons des 2 groupes, sans retrouver de signal au niveau de la rate et des poumons. Cette méthode de double marquage DIR/ Hoechst permettant de confirmer la correspondance entre la prise de greffe *in vivo* (DIR) et en histologie (Hoechst) pour les mêmes souris. Ce modèle présente des limites du fait de la diffusion des marqueurs. Dans ces conditions, la prise de greffe à la suite d'une EPV était trois fois plus importante que sans préparation, démontrant l'intérêt de l'EPV pour une approche de thérapie cellulaire hépatique. Par ailleurs, l'EPV conserve le volume total du foie pour la répartition cellulaire. Ce facteur important est susceptible d'améliorer la prise de greffe des cellules, car il permet d'injecter plus de cellules ce qui augmente l'efficacité de la prise de greffe [425], de préserver un nombre maximal de vaisseaux hépatiques, ce qui jouent un rôle important dans la régénération du foie normal [144, 152, 153, 160] et pourrait ainsi diminuer l'hypertension portale après la transplantation de cellules.

Les essais cliniques ont déjà démontré la sécurité de la transplantation d'hépatocytes, et les patients qui ont subi une transplantation d'hépatocytes ont montré l'absence d'effets indésirables avec amélioration une certaine clinique et/ou de correction partielle du défaut métabolique sous-jacent [181, 471, 472].

Cette option thérapeutique peut être même particulièrement adaptée aux patients atteints d'insuffisance hépatique car notre méthode de préparation du foie receveur, évite de blesser ou de retirer des segments de foie tout en étant réalisable par voie endovasculaire [144, 164].

Ainsi, notre approche constitue une étape importante vers la mise en place d'une technique de préparation du foie receveur applicable à la clinique pour améliorer la prise de greffe des hépatocytes transplantés dans le cadre des maladies métaboliques du foie.

6. CONCLUSION

Il est clair aujourd'hui que les premiers essais cliniques de transplantation d'hépatocytes pour le traitement de déficits métaboliques d'origine hépatique ont démontré la faisabilité de cette approche, sa tolérance, son innocuité et sa pertinence [171, 460]. Cependant, étant donné le caractère transitoire et partiel de la correction, le bénéfice clinique à long terme reste à démontrer. De plus, les rares essais cliniques de transplantation cellulaire déjà conduits ont montré qu'il restait de nombreux obstacles à surmonter avant de pouvoir appliquer cette technique chez l'homme de façon efficace et à plus grande échelle. Le retour vers la recherche préclinique, notamment chez le gros animal, et le développement de nouveaux protocoles de transplantation cellulaire et génique (en utilisant des vecteurs viraux plus performants, des cellules à fort potentiel de transplantation comme les hiPSC et les hESC) est indispensable pour permettre d'essayer d'améliorer la prise de greffe.

Dans ce cadre, la thérapie cellulaire utilisant des cellules souches est une approche très prometteuse pour le développement clinique de la médecine régénérative hépatique. Les cellules souches présentent une source alternative idéale aux hépatocytes adultes pour le traitement des maladies du foie par thérapie cellulaire. Néanmoins, dans un premier temps, il faut démontrer la capacité de ces cellules à se différencier en hépatocytes *in vitro* et à acquérir des fonctions métaboliques majeures comme l'activité des cytochromes P450, l'homéostasie du glucose, le métabolisme de l'ammoniac et la détoxification. Il est nécessaire d'évaluer par la suite leur capacité de greffe. Ces dernières doivent montrer des taux acceptables de greffe ainsi

que de prolifération et de régénération dans le foie receveur après transplantation. De plus, il nous faut démontrer la capacité de ces cellules à corriger les symptômes des maladies dans des modèles animaux pertinents. Dans ce travail de thèse, nous avons isolé des MSC du foie fœtal humain (11-12 semaines de gestation), FL-CSM, démontré leur stabilité, leur profil mésenchymateux avec l'expression de certains facteurs de transcription hépatique et leur multipotence au cours des passages. On a pu ainsi démontrer que les FL-CSM étaient capables de se différencier en hépatoblastes présentant des fonctions majeures des hépatocytes *in vitro* et avaient une bonne capacité de prise de greffe dans le foie receveur de souris nouveau-nées immunodéficientes. Les FL-CSM différenciées ou non puis transplantées étaient capables *in situ* de maturer ou de se différencier puis de maturer, respectivement, dans le foie de l'animal receveur. Ainsi les FL-CSM sont très prometteuses pour une utilisation en thérapie cellulaire des maladies du foie, car même la forme non différenciée, hautement proliférative *in vitro*, est capable de se différencier *in situ* en *hepatocyte-like*. En effet, la différenciation des cellules avant transplantation reste coûteuse et longue, d'autant plus que pour un seul patient, plus de mille milliards de cellules sont nécessaires. Par contre, les cellules *hepatocyte-like* générées pourraient être utilisées comme alternative aux hépatocytes pour les tests pharmacologiques, mais l'évaluation de ce potentiel reste à réaliser. Notre équipe travaille d'ailleurs sur des améliorations dans l'étape de maturation cellulaire afin d'obtenir des cellules *hepatocyte-like* plus matures *in vitro*. La prochaine étape est l'évaluation de la capacité de ces cellules ainsi que celle des FL-CSM natives à améliorer les symptômes d'une maladie métabolique chez l'animal. L'utilisation potentielle des FL-CSM en clinique, impliquera des conditions de culture en GMP/*animal free* qui doivent être établies une fois validé le type de stade cellulaire (natif ou différenciée) avec le meilleur et hypothétique effet thérapeutique.

Il est clair que le pourcentage de prise de greffe dépend de la méthode de préparation du foie avant transplantation. Il faut notamment créer un signal régénératif dans le foie pour que les

cellules transplantées puissent intégrer le parenchyme hépatique. Plusieurs protocoles existent déjà mais l'hépatectomie de 70% reste la technique de référence pour la régénération hépatique dans les modèles animaux. Cependant, cette dernière est une technique invasive non transposable en clinique.

Ainsi la majeure partie de mon travail de thèse s'est organisé autour du concept d'embolisation portale développé à son occasion : l'Embolisation Portale Volumétrique.

Au cours de ces années de recherche chirurgicale fondamentale, nous sommes parvenus à mettre au point un protocole peu invasif de préparation du foie avant la transplantation d'hépatocytes qui est potentiellement transposable en clinique. Je vous ai exposé ce protocole d'EPV dans un modèle murin qui consiste à injecter en intraportal 8 millions de microsphères de calibre 10 μ m en suspension dans du Voluven®. Il est ainsi démontré que l'EPV induit un signal régénératif réparti sur tout le foie estimé à 5% dans les meilleures conditions chez la souris. Cette technique permet de préserver l'ensemble des gros axes vasculaires portaux (éviter la thrombose portale, augmenter le nombre de cellules injectées) et a une action très distale, homogène sans altération anatomique de segment hépatique (ischémie et nécrose). Ainsi nous avons constaté une augmentation la prise de greffe 5 jours après une allotransplantation d'hépatocytes. Cependant, de nombreuses mises au point sont nécessaires en fonction du modèle expérimental utilisé pour valider la faisabilité : type, taille, nombre, concentration des billes, site d'injection, matériel utilisé, nombre de cellules injectables...

Enfin, il faudra valider l'essentiel : la fonctionnalité et la correction des troubles métabolique dans modèles murin. Ce procédé peu invasif, préservant l'architecture du foie, est potentiellement applicable en clinique chez l'homme. Cependant, avant le passage aux essais clinique il faudra parvenir à valider l'efficacité et la sécurité de ce protocole chez le singe avec les adaptations requises par les différences anatomiques et physiologiques qui existent entre la

souris et le singe. Cette nouvelle approche devra aussi être optimisée par la suite en utilisant des microsphères résorbables.

7. REFERENCES

1. Maisonneuve J. Essai sur les névroses de l'estomac. Thèse de médecine de la faculté de Paris 1836.
2. Sappey PC. Traité d'anatomie descriptive. 1889.
3. Fortner JG, Blumgart LH. A historic perspective of liver surgery for tumors at the end of the millennium. *J Am Coll Surg* 2001; 193: 210-222.
4. Frank H N. Atlas d'Anatomie humaine. In Masson E (ed). 2009.
5. Calmont A, Wandzioch E, Tremblay KD et al. An FGF response pathway that mediates hepatic gene induction in embryonic endoderm cells. *Dev Cell* 2006; 11: 339-348.
6. Zaret KS. Genetic programming of liver and pancreas progenitors: lessons for stem-cell differentiation. *Nat Rev Genet* 2008; 9: 329-340.
7. Zhao R, Duncan SA. Embryonic development of the liver. *Hepatology* 2005; 41: 956-967.
8. Lemaigre F. [Embryonic development of the liver: basic biology and pediatric pathology]. *Bull Mem Acad R Med Belg* 2009; 164: 39-42; discussion 43.
9. Lemaigre FP. Mechanisms of liver development: concepts for understanding liver disorders and design of novel therapies. *Gastroenterology* 2009; 137: 62-79.
10. Gualdi R, Bossard P, Zheng M et al. Hepatic specification of the gut endoderm in vitro: cell signaling and transcriptional control. *Genes Dev* 1996; 10: 1670-1682.
11. Jung J, Zheng M, Goldfarb M, Zaret KS. Initiation of mammalian liver development from endoderm by fibroblast growth factors. *Science* 1999; 284: 1998-2003.
12. Rossi JM, Dunn NR, Hogan BL, Zaret KS. Distinct mesodermal signals, including BMPs from the septum transversum mesenchyme, are required in combination for hepatogenesis from the endoderm. *Genes Dev* 2001; 15: 1998-2009.
13. Serls AE, Doherty S, Parvatiyar P et al. Different thresholds of fibroblast growth factors pattern the ventral foregut into liver and lung. *Development* 2005; 132: 35-47.
14. Shiojiri N, Sugiyama Y. Immunolocalization of extracellular matrix components and integrins during mouse liver development. *Hepatology* 2004; 40: 346-355.
15. Zong Y, Panikkar A, Xu J et al. Notch signaling controls liver development by regulating biliary differentiation. *Development* 2009; 136: 1727-1739.
16. Bort R, Signore M, Tremblay K et al. Hex homeobox gene controls the transition of the endoderm to a pseudostratified, cell emergent epithelium for liver bud development. *Dev Biol* 2006; 290: 44-56.
17. Fung SK, Lok AS. Hepatitis B virus genotypes: do they play a role in the outcome of HBV infection? *Hepatology* 2004; 40: 790-792.
18. Si-Tayeb K, Lemaigre FP, Duncan SA. Organogenesis and development of the liver. *Dev Cell* 2010; 18: 175-189.
19. Margagliotti S, Clotman F, Pierreux CE et al. The Onecut transcription factors HNF-6/OC-1 and OC-2 regulate early liver expansion by controlling hepatoblast migration. *Dev Biol* 2007; 311: 579-589.
20. Papoutsi M, Dudas J, Becker J et al. Gene regulation by homeobox transcription factor Prox1 in murine hepatoblasts. *Cell Tissue Res* 2007; 330: 209-220.
21. Margagliotti S, Clotman F, Pierreux CE et al. Role of metalloproteinases at the onset of liver development. *Dev Growth Differ* 2008; 50: 331-338.
22. Fassler R, Meyer M. Consequences of lack of beta 1 integrin gene expression in mice. *Genes Dev* 1995; 9: 1896-1908.

23. Matsumoto K, Miki R, Nakayama M et al. Wnt9a secreted from the walls of hepatic sinusoids is essential for morphogenesis, proliferation, and glycogen accumulation of chick hepatic epithelium. *Dev Biol* 2008; 319: 234-247.
24. Tatsumi N, Miki R, Katsu K, Yokouchi Y. Neurturin-GFRalpha2 signaling controls liver bud migration along the ductus venosus in the chick embryo. *Dev Biol* 2007; 307: 14-28.
25. Zaret KS. Regulatory phases of early liver development: paradigms of organogenesis. *Nat Rev Genet* 2002; 3: 499-512.
26. Kamiya A, Kinoshita T, Miyajima A. Oncostatin M and hepatocyte growth factor induce hepatic maturation via distinct signaling pathways. *FEBS Lett* 2001; 492: 90-94.
27. Suzuki A, Iwama A, Miyashita H et al. Role for growth factors and extracellular matrix in controlling differentiation of prospectively isolated hepatic stem cells. *Development* 2003; 130: 2513-2524.
28. Imamura M, Kojima T, Lan M et al. Oncostatin M induces upregulation of claudin-2 in rodent hepatocytes coinciding with changes in morphology and function of tight junctions. *Exp Cell Res* 2007; 313: 1951-1962.
29. Matsui T, Kinoshita T, Morikawa Y et al. K-Ras mediates cytokine-induced formation of E-cadherin-based adherens junctions during liver development. *EMBO J* 2002; 21: 1021-1030.
30. Kamiya A, Gonzalez FJ. TNF-alpha regulates mouse fetal hepatic maturation induced by oncostatin M and extracellular matrices. *Hepatology* 2004; 40: 527-536.
31. Peault B, Tavian M. Hematopoietic stem cell emergence in the human embryo and fetus. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 996: 132-140.
32. Johnson GR, Jones RO. Differentiation of the mammalian hepatic primordium in vitro. I. Morphogenesis and the onset of haematopoiesis. *J Embryol Exp Morphol* 1973; 30: 83-96.
33. Johnson GR, Moore MA. Role of stem cell migration in initiation of mouse foetal liver haemopoiesis. *Nature* 1975; 258: 726-728.
34. Sugiyama D, Inoue-Yokoo T, Fraser ST et al. Embryonic regulation of the mouse hematopoietic niche. *ScientificWorldJournal* 2011; 11: 1770-1780.
35. Sasaki T, Mizuochi C, Horio Y et al. Regulation of hematopoietic cell clusters in the placental niche through SCF/Kit signaling in embryonic mouse. *Development* 2010; 137: 3941-3952.
36. Baron MH, Isern J, Fraser ST. The embryonic origins of erythropoiesis in mammals. *Blood* 2012; 119: 4828-4837.
37. Pourcher G, Mazurier C, King YY et al. Human fetal liver: an in vitro model of erythropoiesis. *Stem Cells Int* 2011; 2011: 405429.
38. Chou S, Flygare J, Lodish HF. Fetal hepatic progenitors support long-term expansion of hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* 2013; 41: 479-490 e474.
39. Durand C, Dzierzak E. Embryonic beginnings of adult hematopoietic stem cells. *Haematologica* 2005; 90: 100-108.
40. Dzierzak E, Sanchez MJ, Muller A et al. Hematopoietic stem cells: embryonic beginnings. *J Cell Physiol* 1997; 173: 216-218.
41. Luis TC, Killmann NM, Staal FJ. Signal transduction pathways regulating hematopoietic stem cell biology: introduction to a series of Spotlight Reviews. *Leukemia* 2012; 26: 86-90.
42. Chagraoui J, Lepage-Noll A, Anjo A et al. Fetal liver stroma consists of cells in epithelial-to-mesenchymal transition. *Blood* 2003; 101: 2973-2982.
43. Xi J, Li Y, Wang R et al. In vitro large scale production of human mature red blood cells from hematopoietic stem cells by coculturing with human fetal liver stromal cells. *Biomed Res Int* 2013; 2013: 807863.

44. Swain A, Inoue T, Tan KS et al. Intrinsic and extrinsic regulation of mammalian hematopoiesis in the fetal liver. *Histol Histopathol* 2014; 29: 1077-1082.
45. A. Bouchet JC. Anatomie topographique descriptive et fonctionnelle : l'abdomen. 1974; 4: 1946-1988.
46. Rouviere H. Anatomie humaine descriptive et topographique. 1924.
47. Couinaud C. [Definition of hepatic anatomical regions and their value during hepatectomy (author's transl)]. *Chirurgie* 1980; 106: 103-108.
48. Belghiti J. Arguments for a selective approach of preoperative portal vein embolization before major hepatic resection. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2004; 11: 21-24.
49. Weber JB, P.; Jaeck, D. Traitements chirurgicaux des métastases hépatiques. In Elservier (ed) *Encyclopedie médico-chirurgicale*. 2002; 7.
50. Koniaris LG, McKillop IH, Schwartz SI, Zimmers TA. Liver regeneration. *J Am Coll Surg* 2003; 197: 634-659.
51. Palmes D, Spiegel HU. Animal models of liver regeneration. *Biomaterials* 2004; 25: 1601-1611.
52. Young BLJSAHJ. Fonctionnal Histological Atlas. De Boeck 2006.
53. Blouin A, Bolender RP, Weibel ER. Distribution of organelles and membranes between hepatocytes and nonhepatocytes in the rat liver parenchyma. A stereological study. *J Cell Biol* 1977; 72: 441-455.
54. Weibel ER, Staubli W, Gnagi HR, Hess FA. Correlated morphometric and biochemical studies on the liver cell. I. Morphometric model, stereologic methods, and normal morphometric data for rat liver. *J Cell Biol* 1969; 42: 68-91.
55. Feldmann G. The cytoskeleton of the hepatocyte. Structure and functions. *J Hepatol* 1989; 8: 380-386.
56. Desmet VJ. Intrahepatic bile ducts under the lens. *J Hepatol* 1985; 1: 545-559.
57. Desmet VJ. Modulation of the liver in cholestasis. *J Gastroenterol Hepatol* 1992; 7: 313-323.
58. Benedetti A, Bassotti C, Rapino K et al. A morphometric study of the epithelium lining the rat intrahepatic biliary tree. *J Hepatol* 1996; 24: 335-342.
59. Bogert PT, LaRusso NF. Cholangiocyte biology. *Curr Opin Gastroenterol* 2007; 23: 299-305.
60. Saxena R, Theise N. Canals of Hering: recent insights and current knowledge. *Semin Liver Dis* 2004; 24: 43-48.
61. Kuwahara R, Kofman AV, Landis CS et al. The hepatic stem cell niche: identification by label-retaining cell assay. *Hepatology* 2008; 47: 1994-2002.
62. Schmelzer E, Zhang L, Bruce A et al. Human hepatic stem cells from fetal and postnatal donors. *J Exp Med* 2007; 204: 1973-1987.
63. Smedsrod B, De Bleser PJ, Braet F et al. Cell biology of liver endothelial and Kupffer cells. *Gut* 1994; 35: 1509-1516.
64. Wisse E, De Zanger RB, Charels K et al. The liver sieve: considerations concerning the structure and function of endothelial fenestrae, the sinusoidal wall and the space of Disse. *Hepatology* 1985; 5: 683-692.
65. Arias IM. The biology of hepatic endothelial cell fenestrae. *Prog Liver Dis* 1990; 9: 11-26.
66. Sumpio BE, Riley JT, Dardik A. Cells in focus: endothelial cell. *Int J Biochem Cell Biol* 2002; 34: 1508-1512.
67. Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev* 2008; 88: 125-172.
68. Frevert U, Engelmann S, Zougbede S et al. Intravital observation of *Plasmodium berghei* sporozoite infection of the liver. *PLoS Biol* 2005; 3: e192.

69. Parker GA, Picut CA. Liver immunobiology. *Toxicol Pathol* 2005; 33: 52-62.
70. Strick-Marchand H, Masse GX, Weiss MC, Di Santo JP. Lymphocytes support oval cell-dependent liver regeneration. *J Immunol* 2008; 181: 2764-2771.
71. Drasdo D, Bode J, Dahmen U et al. The virtual liver: state of the art and future perspectives. *Arch Toxicol* 2014.
72. Hohme S, Hengstler JG, Brulport M et al. Mathematical modelling of liver regeneration after intoxication with CCl₄. *Chem Biol Interact* 2007; 168: 74-93.
73. Schliess F, Hoehme S, Henkel SG et al. Integrated metabolic spatial-temporal model for the prediction of ammonia detoxification during liver damage and regeneration. *Hepatology* 2014.
74. Gumucio DL, Shelton DA, Blanchard-McQuate K et al. Differential phylogenetic footprinting as a means to identify base changes responsible for recruitment of the anthropoid gamma gene to a fetal expression pattern. *J Biol Chem* 1994; 269: 15371-15380.
75. Burke ZD, Reed KR, Phesse TJ et al. Liver zonation occurs through a beta-catenin-dependent, c-Myc-independent mechanism. *Gastroenterology* 2009; 136: 2316-2324 e2311-2313.
76. Colletti M, Cicchini C, Conigliaro A et al. Convergence of Wnt signaling on the HNF4alpha-driven transcription in controlling liver zonation. *Gastroenterology* 2009; 137: 660-672.
77. Benhamouche S, Decaens T, Godard C et al. Apc tumor suppressor gene is the "zonation-keeper" of mouse liver. *Dev Cell* 2006; 10: 759-770.
78. Rajvanshi P, Liu D, Ott M et al. Fractionation of rat hepatocyte subpopulations with varying metabolic potential, proliferative capacity, and retroviral gene transfer efficiency. *Exp Cell Res* 1998; 244: 405-419.
79. Stanulovic VS, Kymizi I, Kruithof-de Julio M et al. Hepatic HNF4alpha deficiency induces periportal expression of glutamine synthetase and other pericentral enzymes. *Hepatology* 2007; 45: 433-444.
80. Drocourt L, Ourlin JC, Pascussi JM et al. Expression of CYP3A4, CYP2B6, and CYP2C9 is regulated by the vitamin D receptor pathway in primary human hepatocytes. *J Biol Chem* 2002; 277: 25125-25132.
81. Pascussi JM, Robert A, Nguyen M et al. Possible involvement of pregnane X receptor-enhanced CYP24 expression in drug-induced osteomalacia. *J Clin Invest* 2005; 115: 177-186.
82. Benhamou Jean Pierre BJ, McIntyre Neil, Rizetto Mario, Rodes Jua *Hépatologie clinique Coll. Traités* 2002.
83. Bernuau J, Rueff B, Benhamou JP. Fulminant and subfulminant liver failure: definitions and causes. *Semin Liver Dis* 1986; 6: 97-106.
84. Kim WR, Brown RS, Jr., Terrault NA, El-Serag H. Burden of liver disease in the United States: summary of a workshop. *Hepatology* 2002; 36: 227-242.
85. Larrey D. Epidemiology and individual susceptibility to adverse drug reactions affecting the liver. *Semin Liver Dis* 2002; 22: 145-155.
86. Makin AJ, Wendon J, Williams R. A 7-year experience of severe acetaminophen-induced hepatotoxicity (1987-1993). *Gastroenterology* 1995; 109: 1907-1916.
87. Bernal W, Auzinger G, Dhawan A, Wendon J. Acute liver failure. *Lancet* 2010; 376: 190-201.
88. McPhail MJ, Wendon JA, Bernal W. Meta-analysis of performance of Kings's College Hospital Criteria in prediction of outcome in non-paracetamol-induced acute liver failure. *J Hepatol* 2010; 53: 492-499.
89. Wardle EN, Wright NA. Endotoxin and acute renal failure associated with obstructive jaundice. *Br Med J* 1970; 4: 472-474.

90. Sokal EM, Silva ES, Hermans D et al. Orthotopic liver transplantation for Crigler-Najjar type I disease in six children. *Transplantation* 1995; 60: 1095-1098.
91. Stephenne X, Najimi M, Sibille C et al. Sustained engraftment and tissue enzyme activity after liver cell transplantation for argininosuccinate lyase deficiency. *Gastroenterology* 2006; 130: 1317-1323.
92. Lee WM, Squires RH, Jr., Nyberg SL et al. Acute liver failure: Summary of a workshop. *Hepatology* 2008; 47: 1401-1415.
93. Ichai P, Samuel D. [Liver transplantation for fulminant hepatitis]. *Gastroenterol Clin Biol* 2009; 33: 51-60.
94. Lee WM, Hynan LS, Rossaro L et al. Intravenous N-acetylcysteine improves transplant-free survival in early stage non-acetaminophen acute liver failure. *Gastroenterology* 2009; 137: 856-864, 864 e851.
95. Jalan R. Acute liver failure: current management and future prospects. *J Hepatol* 2005; 42 Suppl: S115-123.
96. Starzl TE, Marchioro TL, Vonkaulla KN et al. Homotransplantation of the Liver in Humans. *Surg Gynecol Obstet* 1963; 117: 659-676.
97. Calne RY, Williams R. Orthotopic liver transplantation: the first 60 patients. *Br Med J* 1977; 1: 471-476.
98. Starzl TE, Groth CG, Brettschneider L et al. Extended survival in 3 cases of orthotopic homotransplantation of the human liver. *Surgery* 1968; 63: 549-563.
99. biomedecine Ad. Activité de prélèvement et de greffe : organes, tissus et cellules. Synthèse nationale 2013 - Edition juillet 2014 - Extraction des données mars 2014. In. Agence de biomedecine.gouv: 2015.
100. Mazaris EM, Roussos CT, Papalois VE. Hepatocyte transplantation: a review of worldwide clinical developments and experiences. *Exp Clin Transplant* 2005; 3: 306-315.
101. Pietrosi G, Vizzini GB, Gruttadauria S, Gridelli B. Clinical applications of hepatocyte transplantation. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 2074-2077.
102. Transplant USOPaTNatSRo. In. 2015.
103. Bretherick AD, Craig DG, Masterton G et al. Acute liver failure in Scotland between 1992 and 2009; incidence, aetiology and outcome. *QJM* 2011; 104: 945-956.
104. Marudanayagam R, Shanmugam V, Gunson B et al. Aetiology and outcome of acute liver failure. *HPB (Oxford)* 2009; 11: 429-434.
105. Bernuau J, Durand F. Early prediction of encephalopathy in hospitalized patients with severe acute liver disease: the narrow window of opportunity for transplant-free survival. *J Hepatol* 2009; 51: 977-980.
106. Dhiman RK, Jain S, Maheshwari U et al. Early indicators of prognosis in fulminant hepatic failure: an assessment of the Model for End-Stage Liver Disease (MELD) and King's College Hospital criteria. *Liver Transpl* 2007; 13: 814-821.
107. Anand AC, Nightingale P, Neuberger JM. Early indicators of prognosis in fulminant hepatic failure: an assessment of the King's criteria. *J Hepatol* 1997; 26: 62-68.
108. O'Grady JG, Alexander GJ, Hayllar KM, Williams R. Early indicators of prognosis in fulminant hepatic failure. *Gastroenterology* 1989; 97: 439-445.
109. Nyberg SL. Bridging the gap: advances in artificial liver support. *Liver Transpl* 2012; 18 Suppl 2: S10-14.
110. Stange J, Mitzner SR, Risler T et al. Molecular adsorbent recycling system (MARS): clinical results of a new membrane-based blood purification system for bioartificial liver support. *Artif Organs* 1999; 23: 319-330.
111. Hassanein TI, Tofteng F, Brown RS, Jr. et al. Randomized controlled study of extracorporeal albumin dialysis for hepatic encephalopathy in advanced cirrhosis. *Hepatology* 2007; 46: 1853-1862.

112. Sen S, Davies NA, Mookerjee RP et al. Pathophysiological effects of albumin dialysis in acute-on-chronic liver failure: a randomized controlled study. *Liver Transpl* 2004; 10: 1109-1119.
113. Arroyo V, Fernandez J, Mas A, Escorsell A. Molecular adsorbents recirculating system (MARS) and the failing liver: a negative editorial for a positive trial? *Hepatology* 2008; 47: 2143-2144.
114. Krisper P, Haditsch B, Stauber R et al. In vivo quantification of liver dialysis: comparison of albumin dialysis and fractionated plasma separation. *J Hepatol* 2005; 43: 451-457.
115. Krisper P, Stadlbauer V, Stauber RE. Clearing of toxic substances: are there differences between the available liver support devices? *Liver Int* 2011; 31 Suppl 3: 5-8.
116. Faenza S, Baraldi O, Bernardi M et al. Mars and Prometheus: our clinical experience in acute chronic liver failure. *Transplant Proc* 2008; 40: 1169-1171.
117. Kribben A, Gerken G, Haag S et al. Effects of fractionated plasma separation and adsorption on survival in patients with acute-on-chronic liver failure. *Gastroenterology* 2012; 142: 782-789 e783.
118. Carpentier B, Gautier A, Legallais C. Artificial and bioartificial liver devices: present and future. *Gut* 2009; 58: 1690-1702.
119. Ellis AJ, Hughes RD, Wendon JA et al. Pilot-controlled trial of the extracorporeal liver assist device in acute liver failure. *Hepatology* 1996; 24: 1446-1451.
120. Sussman NL, Chong MG, Koussayer T et al. Reversal of fulminant hepatic failure using an extracorporeal liver assist device. *Hepatology* 1992; 16: 60-65.
121. Rozga J, Williams F, Ro MS et al. Development of a bioartificial liver: properties and function of a hollow-fiber module inoculated with liver cells. *Hepatology* 1993; 17: 258-265.
122. Gerlach JC, Brombacher J, Kloppel K et al. Comparison of four methods for mass hepatocyte isolation from pig and human livers. *Transplantation* 1994; 57: 1318-1322.
123. Fremond B, Joly A, Desille M et al. Cell-based therapy of acute liver failure: the extracorporeal bioartificial liver. *Cell Biol Toxicol* 1996; 12: 325-329.
124. Joly A, Desjardins JF, Fremond B et al. Survival, proliferation, and functions of porcine hepatocytes encapsulated in coated alginate beads: a step toward a reliable bioartificial liver. *Transplantation* 1997; 63: 795-803.
125. Desille M, Mahler S, Seguin P et al. Reduced encephalopathy in pigs with ischemia-induced acute hepatic failure treated with a bioartificial liver containing alginate-entrapped hepatocytes. *Crit Care Med* 2002; 30: 658-663.
126. Desille M, Fremond B, Mahler S et al. Improvement of the neurological status of pigs with acute liver failure by hepatocytes immobilized in alginate gel beads inoculated in an extracorporeal bioartificial liver. *Transplant Proc* 2001; 33: 1932-1934.
127. Samuel D, Ichai P, Feray C et al. Neurological improvement during bioartificial liver sessions in patients with acute liver failure awaiting transplantation. *Transplantation* 2002; 73: 257-264.
128. Stockmann HB, Hiemstra CA, Marquet RL, JN IJ. Extracorporeal perfusion for the treatment of acute liver failure. *Ann Surg* 2000; 231: 460-470.
129. Chari RS, Collins BH, Magee JC et al. Brief report: treatment of hepatic failure with ex vivo pig-liver perfusion followed by liver transplantation. *N Engl J Med* 1994; 331: 234-237.
130. Pierson RN, 3rd, Dorling A, Ayares D et al. Current status of xenotransplantation and prospects for clinical application. *Xenotransplantation* 2009; 16: 263-280.
131. Mercer D, Tang M, Marino IR et al. Changes in biliary (high-molecular-mass) and liver isoforms of alkaline phosphatase after baboon-to-human liver transplantation. *Clin Chem* 1994; 40: 1335-1339.
132. Vine W, Kier A. Baboon-to-human liver transplantation. *Lancet* 1993; 341: 1158.

133. Cavaille-Coll M, Mielach FA. Choice of cyclophosphamide dose in baboon-to-human liver transplantation. *Lancet* 1993; 341: 639.
134. Starzl TE, Fung J, Tzakis A et al. Baboon-to-human liver transplantation. *Lancet* 1993; 341: 65-71.
135. Makowka L, Wu GD, Hoffman A et al. Immunohistopathologic lesions associated with the rejection of a pig-to-human liver xenograft. *Transplant Proc* 1994; 26: 1074-1075.
136. Chapman LE, Heneine W, Switzer W et al. Xenotransplantation: the potential for xenogeneic infections. *Transplant Proc* 1999; 31: 909-910.
137. Chapman LE, Folks TM, Salomon DR et al. Xenotransplantation and xenogeneic infections. *N Engl J Med* 1995; 333: 1498-1501.
138. Fox IJ, Chowdhury JR. Hepatocyte transplantation. *Am J Transplant* 2004; 4 Suppl 6: 7-13.
139. Eksler B, Ezzelarab M, Hara H et al. Clinical xenotransplantation: the next medical revolution? *Lancet* 2012; 379: 672-683.
140. Lin CC, Ezzelarab M, Shapiro R et al. Recipient tissue factor expression is associated with consumptive coagulopathy in pig-to-primate kidney xenotransplantation. *Am J Transplant* 2010; 10: 1556-1568.
141. Court FG, Wemyss-Holden SA, Dennison AR, Maddern GJ. The mystery of liver regeneration. *Br J Surg* 2002; 89: 1089-1095.
142. Losser MR, Payen D. Mechanisms of liver damage. *Semin Liver Dis* 1996; 16: 357-367.
143. Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. Liver regeneration. *Hepatology* 2006; 43: S45-53.
144. Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. Liver regeneration. *J Hepatol* 2012; 57: 692-694.
145. Graves R. Greek myths. Cassels and Co, London 1958.
146. Michalopoulos GK. Liver regeneration after partial hepatectomy: critical analysis of mechanistic dilemmas. *Am J Pathol* 2010; 176: 2-13.
147. Michalopoulos GK, DeFrances MC. Liver regeneration. *Science* 1997; 276: 60-66.
148. Beliaeva ID. [Effect of repeated partial hepatectomy on cell division in regenerating rat liver]. *Biull Eksp Biol Med* 1977; 84: 488-491.
149. Ingle DJ. Technic of repeated partial hepatectomy in the rat. *Proc Soc Exp Biol Med* 1954; 87: 251-253.
150. Cherqui D, Emond JC, Pietrabissa A et al. [Orthotopic liver transplantation and living donors. An experimental study in the dog]. *Chirurgie* 1990; 116: 711-720.
151. Mortensen KE, Revhaug A. Liver regeneration in surgical animal models - a historical perspective and clinical implications. *Eur Surg Res* 2011; 46: 1-18.
152. Ding BS, Cao Z, Lis R et al. Divergent angiocrine signals from vascular niche balance liver regeneration and fibrosis. *Nature* 2014; 505: 97-102.
153. Ding BS, Nolan DJ, Butler JM et al. Inductive angiocrine signals from sinusoidal endothelium are required for liver regeneration. *Nature* 2010; 468: 310-315.
154. Makino R, Hayashi K, Sugimura T. C-myc transcript is induced in rat liver at a very early stage of regeneration or by cycloheximide treatment. *Nature* 1984; 310: 697-698.
155. Bucher NL. Liver regeneration: an overview. *J Gastroenterol Hepatol* 1991; 6: 615-624.
156. Fausto N, Vanlancker JL. Molecular Mechanisms of Liver Regeneration. Iv. Thymidyllic Kinase and Deoxyribonucleic Acid Polymerase Activities in Normal and Regenerating Liver. *J Biol Chem* 1965; 240: 1247-1255.
157. Weglarz TC, Sandgren EP. Timing of hepatocyte entry into DNA synthesis after partial hepatectomy is cell autonomous. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 12595-12600.
158. Wu Y, Guo F, Liu J et al. Triple labeling with three thymidine analogs reveals a well-orchestrated regulation of hepatocyte proliferation during liver regeneration. *Hepatol Res* 2011; 41: 1230-1239.

159. Furuyama K, Kawaguchi Y, Akiyama H et al. Continuous cell supply from a Sox9-expressing progenitor zone in adult liver, exocrine pancreas and intestine. *Nat Genet* 2011; 43: 34-41.
160. Malato Y, Naqvi S, Schurmann N et al. Fate tracing of mature hepatocytes in mouse liver homeostasis and regeneration. *J Clin Invest* 2011; 121: 4850-4860.
161. Fausto N. Liver regeneration. *J Hepatol* 2000; 32: 19-31.
162. Greenbaum LE, Wells RG. The role of stem cells in liver repair and fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol* 2011; 43: 222-229.
163. Kmiec Z. Cooperation of liver cells in health and disease. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 2001; 161: III-XIII, 1-151.
164. Clavien PA, Petrowsky H, DeOliveira ML, Graf R. Strategies for safer liver surgery and partial liver transplantation. *N Engl J Med* 2007; 356: 1545-1559.
165. Liu L, Yannam GR, Nishikawa T et al. The microenvironment in hepatocyte regeneration and function in rats with advanced cirrhosis. *Hepatology* 2012; 55: 1529-1539.
166. Kurinna S, Barton MC. Cascades of transcription regulation during liver regeneration. *Int J Biochem Cell Biol* 2011; 43: 189-197.
167. Stuart-Harris R, Caldas C, Pinder SE, Pharoah P. Proliferation markers and survival in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 85 studies in 32,825 patients. *Breast* 2008; 17: 323-334.
168. Luporsi E, Andre F, Spyrtos F et al. Ki-67: level of evidence and methodological considerations for its role in the clinical management of breast cancer: analytical and critical review. *Breast Cancer Res Treat* 2012; 132: 895-915.
169. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 1983; 31: 13-20.
170. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 2000; 182: 311-322.
171. Hansel MC, Gramignoli R, Skvorak KJ et al. The history and use of human hepatocytes for the treatment of liver diseases: the first 100 patients. *Curr Protoc Toxicol* 2014; 62: 14 12 11-14 12 23.
172. Dagher I, Boudechiche L, Branger J et al. Efficient hepatocyte engraftment in a nonhuman primate model after partial portal vein embolization. *Transplantation* 2006; 82: 1067-1073.
173. Fox IJ, Roy-Chowdhury J. Hepatocyte transplantation. *J Hepatol* 2004; 40: 878-886.
174. Sauer V, Siaj R, Stoppeler S et al. Repeated transplantation of hepatocytes prevents fulminant hepatitis in a rat model of Wilson's disease. *Liver Transpl* 2012; 18: 248-259.
175. Hughes RD, Mitry RR, Dhawan A. Current status of hepatocyte transplantation. *Transplantation* 2012; 93: 342-347.
176. Terry C, Dhawan A, Mitry RR et al. Optimization of the cryopreservation and thawing protocol for human hepatocytes for use in cell transplantation. *Liver Transpl* 2010; 16: 229-237.
177. Vosough M, Moslem M, Pournasr B, Baharvand H. Cell-based therapeutics for liver disorders. *Br Med Bull* 2011; 100: 157-172.
178. Nussler A, Konig S, Ott M et al. Present status and perspectives of cell-based therapies for liver diseases. *J Hepatol* 2006; 45: 144-159.
179. Enosawa S, Horikawa R, Yamamoto A et al. Hepatocyte transplantation using a living donor reduced graft in a baby with ornithine transcarbamylase deficiency: a novel source of hepatocytes. *Liver Transpl* 2014; 20: 391-393.
180. Puppi J, Strom SC, Hughes RD et al. Improving the techniques for human hepatocyte transplantation: report from a consensus meeting in London. *Cell Transplant* 2012; 21: 1-10.

181. Wan Z, Zhang XG, Liu ZW, Lv Y. Therapeutic liver repopulation for metabolic liver diseases: Advances from bench to bedside. *Hepatol Res* 2013; 43: 122-130.
182. Gupta S. Hepatocyte transplantation. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17 Suppl 3: S287-293.
183. Hata T, Uemoto S, Fujimoto Y et al. Transplantation of engineered chimeric liver with autologous hepatocytes and xenobiotic scaffold. *Ann Surg* 2013; 257: 542-547.
184. Brown MS, Goldstein JL. Expression of the familial hypercholesterolemia gene in heterozygotes: mechanism for a dominant disorder in man. *Science* 1974; 185: 61-63.
185. Chowdhury JR, Grossman M, Gupta S et al. Long-term improvement of hypercholesterolemia after ex vivo gene therapy in LDLR-deficient rabbits. *Science* 1991; 254: 1802-1805.
186. Fox IJ, Chowdhury JR, Kaufman SS et al. Treatment of the Crigler-Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation. *N Engl J Med* 1998; 338: 1422-1426.
187. Grossman M, Rader DJ, Muller DW et al. A pilot study of ex vivo gene therapy for homozygous familial hypercholesterolaemia. *Nat Med* 1995; 1: 1148-1154.
188. Grossman M, Raper SE, Kozarsky K et al. Successful ex vivo gene therapy directed to liver in a patient with familial hypercholesterolaemia. *Nat Genet* 1994; 6: 335-341.
189. Muraca M, Gerunda G, Neri D et al. Hepatocyte transplantation as a treatment for glycogen storage disease type 1a. *Lancet* 2002; 359: 317-318.
190. Ponder KP, Gupta S, Leland F et al. Mouse hepatocytes migrate to liver parenchyma and function indefinitely after intrasplenic transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 1217-1221.
191. Gupta S, Rajvanshi P, Lee CD. Integration of transplanted hepatocytes into host liver plates demonstrated with dipeptidyl peptidase IV-deficient rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 5860-5864.
192. Rhim JA, Sandgren EP, Degen JL et al. Replacement of diseased mouse liver by hepatic cell transplantation. *Science* 1994; 263: 1149-1152.
193. Guha C, Parashar B, Deb NJ et al. Normal hepatocytes correct serum bilirubin after repopulation of Gunn rat liver subjected to irradiation/partial resection. *Hepatology* 2002; 36: 354-362.
194. Guha C, Sharma A, Gupta S et al. Amelioration of radiation-induced liver damage in partially hepatectomized rats by hepatocyte transplantation. *Cancer Res* 1999; 59: 5871-5874.
195. Laconi E, Oren R, Mukhopadhyay DK et al. Long-term, near-total liver replacement by transplantation of isolated hepatocytes in rats treated with retrorsine. *Am J Pathol* 1998; 153: 319-329.
196. Gupta S, Chowdhury JR. Therapeutic potential of hepatocyte transplantation. *Semin Cell Dev Biol* 2002; 13: 439-446.
197. Yu Y, Fisher JE, Lillegard JB et al. Cell therapies for liver diseases. *Liver Transpl* 2012; 18: 9-21.
198. Danos O, Mulligan RC. Safe and efficient generation of recombinant retroviruses with amphotropic and ecotropic host ranges. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85: 6460-6464.
199. Roe T, Reynolds TC, Yu G, Brown PO. Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis. *EMBO J* 1993; 12: 2099-2108.
200. Kass-Eisler A, Falck-Pedersen E, Elfenbein DH et al. The impact of developmental stage, route of administration and the immune system on adenovirus-mediated gene transfer. *Gene Ther* 1994; 1: 395-402.
201. Yao XL, Nakagawa S, Gao JQ. Current targeting strategies for adenovirus vectors in cancer gene therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 2011; 11: 810-825.

202. Raper SE, Chirmule N, Lee FS et al. Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol Genet Metab* 2003; 80: 148-158.
203. Samulski RJ, Zhu X, Xiao X et al. Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19. *EMBO J* 1991; 10: 3941-3950.
204. Grieger JC, Samulski RJ. Adeno-associated virus vectorology, manufacturing, and clinical applications. *Methods Enzymol* 2012; 507: 229-254.
205. Ortolano S, Spuch C, Navarro C. Present and future of adeno associated virus based gene therapy approaches. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov* 2012; 6: 47-66.
206. Carter BJ. Adeno-associated virus vectors in clinical trials. *Hum Gene Ther* 2005; 16: 541-550.
207. Snyder RO, Miao CH, Patijn GA et al. Persistent and therapeutic concentrations of human factor IX in mice after hepatic gene transfer of recombinant AAV vectors. *Nat Genet* 1997; 16: 270-276.
208. Tang H, Kuhen KL, Wong-Staal F. Lentivirus replication and regulation. *Annu Rev Genet* 1999; 33: 133-170.
209. Follenzi A, Sabatino G, Lombardo A et al. Efficient gene delivery and targeted expression to hepatocytes in vivo by improved lentiviral vectors. *Hum Gene Ther* 2002; 13: 243-260.
210. Naldini L, Blomer U, Gallay P et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 1996; 272: 263-267.
211. Sirven A, Pflumio F, Zennou V et al. The human immunodeficiency virus type-1 central DNA flap is a crucial determinant for lentiviral vector nuclear import and gene transduction of human hematopoietic stem cells. *Blood* 2000; 96: 4103-4110.
212. Regimbeau JM, Mallet VO, Bralet MP et al. [Transplantation of isolated hepatocytes. Principles, mechanisms, animal models, clinical results]. *Gastroenterol Clin Biol* 2002; 26: 591-601.
213. Dhawan A, Puppi J, Hughes RD, Mitry RR. Human hepatocyte transplantation: current experience and future challenges. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010; 7: 288-298.
214. Fisher RA, Strom SC. Human hepatocyte transplantation: worldwide results. *Transplantation* 2006; 82: 441-449.
215. Allen KJ, Soriano HE. Liver cell transplantation: the road to clinical application. *J Lab Clin Med* 2001; 138: 298-312.
216. Demetriou AA, Levenson SM, Novikoff PM et al. Survival, organization, and function of microcarrier-attached hepatocytes transplanted in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83: 7475-7479.
217. Guibert EE, Mediavilla MG, Mamprin ME, Rodriguez JV. Hypothermic storage of periportal and perivenous rat hepatocytes. *Cell Transplant* 1998; 7: 345-355.
218. Malhi H, Gupta S. Hepatocyte transplantation: new horizons and challenges. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2001; 8: 40-50.
219. Lorenzo M, Angrisani L, Santoro A, Di Salvo E. [Hepatocyte transplantation. From experimentation to therapeutic attempts in man]. *G Chir* 1994; 15: 59-63.
220. Mito M, Kusano M, Kawaura Y. Hepatocyte transplantation in man. *Transplant Proc* 1992; 24: 3052-3053.
221. Strom SC, Fisher RA, Rubinstein WS et al. Transplantation of human hepatocytes. *Transplant Proc* 1997; 29: 2103-2106.
222. Strom SC, Chowdhury JR, Fox IJ. Hepatocyte transplantation for the treatment of human disease. *Semin Liver Dis* 1999; 19: 39-48.
223. Horslen SP, McCowan TC, Goertzen TC et al. Isolated hepatocyte transplantation in an infant with a severe urea cycle disorder. *Pediatrics* 2003; 111: 1262-1267.

224. Nagata H, Ito M, Shiota C et al. Route of hepatocyte delivery affects hepatocyte engraftment in the spleen. *Transplantation* 2003; 76: 732-734.
225. Bilir BM, Guinette D, Karrer F et al. Hepatocyte transplantation in acute liver failure. *Liver Transpl* 2000; 6: 32-40.
226. Strom SC, Fisher RA, Thompson MT et al. Hepatocyte transplantation as a bridge to orthotopic liver transplantation in terminal liver failure. *Transplantation* 1997; 63: 559-569.
227. Ambrosino G, Varotto S, Strom SC et al. Isolated hepatocyte transplantation for Crigler-Najjar syndrome type 1. *Cell Transplant* 2005; 14: 151-157.
228. Hughes RD, Mitry RR, Dhawan A. Hepatocyte transplantation for metabolic liver disease: UK experience. *J R Soc Med* 2005; 98: 341-345.
229. Ribes-Koninckx C, Ibars EP, Calzado Agrasot MA et al. Clinical outcome of hepatocyte transplantation in four pediatric patients with inherited metabolic diseases. *Cell Transplant* 2012; 21: 2267-2282.
230. Horslen SP, Fox IJ. Hepatocyte transplantation. *Transplantation* 2004; 77: 1481-1486.
231. Dhawan A, Mitry RR, Hughes RD et al. Hepatocyte transplantation for inherited factor VII deficiency. *Transplantation* 2004; 78: 1812-1814.
232. Donato MT, Lahoz A, Montero S et al. Functional assessment of the quality of human hepatocyte preparations for cell transplantation. *Cell Transplant* 2008; 17: 1211-1219.
233. Stephenne X, Najimi M, Ngoc DK et al. Cryopreservation of human hepatocytes alters the mitochondrial respiratory chain complex 1. *Cell Transplant* 2007; 16: 409-419.
234. Anderson NG. The mass isolation of whole cells from rat liver. *Science* 1953; 117: 627-628.
235. Berry MN, Grivell AR, Grivell MB, Phillips JW. Isolated hepatocytes--past, present and future. *Cell Biol Toxicol* 1997; 13: 223-233.
236. Diener B, Utesch D, Beer N et al. A method for the cryopreservation of liver parenchymal cells for studies of xenobiotics. *Cryobiology* 1993; 30: 116-127.
237. Andreoletti M, Loux N, Vons C et al. Engraftment of autologous retrovirally transduced hepatocytes after intraportal transplantation into nonhuman primates: implication for ex vivo gene therapy. *Hum Gene Ther* 2001; 12: 169-179.
238. Grompe M. Principles of therapeutic liver repopulation. *J Inherit Metab Dis* 2006; 29: 421-425.
239. Sandgren EP, Palmiter RD, Heckel JL et al. Complete hepatic regeneration after somatic deletion of an albumin-plasminogen activator transgene. *Cell* 1991; 66: 245-256.
240. Rhim JA, Sandgren EP, Palmiter RD, Brinster RL. Complete reconstitution of mouse liver with xenogeneic hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 4942-4946.
241. Overturf K, al-Dhalimy M, Ou CN et al. Adenovirus-mediated gene therapy in a mouse model of hereditary tyrosinemia type I. *Hum Gene Ther* 1997; 8: 513-521.
242. Dandri M, Burda MR, Zuckerman DM et al. Chronic infection with hepatitis B viruses and antiviral drug evaluation in uPA mice after liver repopulation with tupaia hepatocytes. *J Hepatol* 2005; 42: 54-60.
243. Suzuki A, Zheng YW, Kaneko S et al. Clonal identification and characterization of self-renewing pluripotent stem cells in the developing liver. *J Cell Biol* 2002; 156: 173-184.
244. Mahieu-Caputo D, Allain JE, Branger J et al. Repopulation of athymic mouse liver by cryopreserved early human fetal hepatoblasts. *Hum Gene Ther* 2004; 15: 1219-1228.
245. Delgado JP, Vanneaux V, Branger J et al. The role of HGF on invasive properties and repopulation potential of human fetal hepatic progenitor cells. *Exp Cell Res* 2009; 315: 3396-3405.
246. Cheng K, Benten D, Bhargava K et al. Hepatic targeting and biodistribution of human fetal liver stem/progenitor cells and adult hepatocytes in mice. *Hepatology* 2009; 50: 1194-1203.

247. Haridass D, Yuan Q, Becker PD et al. Repopulation efficiencies of adult hepatocytes, fetal liver progenitor cells, and embryonic stem cell-derived hepatic cells in albumin-promoter-enhancer urokinase-type plasminogen activator mice. *Am J Pathol* 2009; 175: 1483-1492.
248. Wilson JW, Leduc EH. Role of cholangioles in restoration of the liver of the mouse after dietary injury. *J Pathol Bacteriol* 1958; 76: 441-449.
249. Evarts RP, Nagy P, Nakatsukasa H et al. In vivo differentiation of rat liver oval cells into hepatocytes. *Cancer Res* 1989; 49: 1541-1547.
250. Evarts RP, Nagy P, Marsden E, Thorgeirsson SS. A precursor-product relationship exists between oval cells and hepatocytes in rat liver. *Carcinogenesis* 1987; 8: 1737-1740.
251. Wang X, Foster M, Al-Dhalimy M et al. The origin and liver repopulating capacity of murine oval cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100 Suppl 1: 11881-11888.
252. Song S, Witek RP, Lu Y et al. Ex vivo transduced liver progenitor cells as a platform for gene therapy in mice. *Hepatology* 2004; 40: 918-924.
253. Dong HH, Xiang S, Chen XP et al. The epithelial-mesenchymal transition promotes transdifferentiation of subcutaneously implanted hepatic oval cells into mesenchymal tumor tissue. *Stem Cells Dev* 2009; 18: 1293-1298.
254. Roskams TA, Libbrecht L, Desmet VJ. Progenitor cells in diseased human liver. *Semin Liver Dis* 2003; 23: 385-396.
255. Cardinale V, Wang Y, Carpino G et al. The biliary tree--a reservoir of multipotent stem cells. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2012; 9: 231-240.
256. Rodrigo-Torres D, Affo S, Coll M et al. The biliary epithelium gives rise to liver progenitor cells. *Hepatology* 2014; 60: 1367-1377.
257. Cardinale V, Carpino G, Gentile R et al. Transplantation of human fetal biliary tree stem/progenitor cells into two patients with advanced liver cirrhosis. *BMC Gastroenterol* 2014; 14: 204.
258. Lanzoni G, Oikawa T, Wang Y et al. Concise review: clinical programs of stem cell therapies for liver and pancreas. *Stem Cells* 2013; 31: 2047-2060.
259. Cai J, Zhao Y, Liu Y et al. Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional hepatic cells. *Hepatology* 2007; 45: 1229-1239.
260. Amit M, Carpenter MK, Inokuma MS et al. Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev Biol* 2000; 227: 271-278.
261. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282: 1145-1147.
262. Villa C, Erratico S, Razini P et al. In vivo tracking of stem cell by nanotechnologies: future prospects for mouse to human translation. *Tissue Eng Part B Rev* 2011; 17: 1-11.
263. Zeng X, Rao MS. Human embryonic stem cells: long term stability, absence of senescence and a potential cell source for neural replacement. *Neuroscience* 2007; 145: 1348-1358.
264. Chng Z, Vallier L, Pedersen R. Activin/nodal signaling and pluripotency. *Vitam Horm* 2011; 85: 39-58.
265. Vallier L, Touboul T, Chng Z et al. Early cell fate decisions of human embryonic stem cells and mouse epiblast stem cells are controlled by the same signalling pathways. *PLoS One* 2009; 4: e6082.
266. Agarwal S, Holton KL, Lanza R. Efficient differentiation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2008; 26: 1117-1127.
267. Baharvand H, Hashemi SM, Shahsavani M. Differentiation of human embryonic stem cells into functional hepatocyte-like cells in a serum-free adherent culture condition. *Differentiation* 2008; 76: 465-477.

268. D'Amour KA, Agulnick AD, Eliazer S et al. Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm. *Nat Biotechnol* 2005; 23: 1534-1541.
269. Hay DC, Fletcher J, Payne C et al. Highly efficient differentiation of hESCs to functional hepatic endoderm requires ActivinA and Wnt3a signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 12301-12306.
270. Seguin CA, Draper JS, Nagy A, Rossant J. Establishment of endoderm progenitors by SOX transcription factor expression in human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 2008; 3: 182-195.
271. Si-Tayeb K, Noto FK, Nagaoka M et al. Highly efficient generation of human hepatocyte-like cells from induced pluripotent stem cells. *Hepatology* 2010; 51: 297-305.
272. Basma H, Soto-Gutierrez A, Yannam GR et al. Differentiation and transplantation of human embryonic stem cell-derived hepatocytes. *Gastroenterology* 2009; 136: 990-999.
273. Touboul T, Vallier L, Weber A. [Robust differentiation of fetal hepatocytes from human embryonic stem cells and iPS]. *Med Sci (Paris)* 2010; 26: 1061-1066.
274. Inamura M, Kawabata K, Takayama K et al. Efficient generation of hepatoblasts from human ES cells and iPS cells by transient overexpression of homeobox gene HEX. *Mol Ther* 2011; 19: 400-407.
275. Ishii T, Yasuchika K, Machimoto T et al. Transplantation of embryonic stem cell-derived endodermal cells into mice with induced lethal liver damage. *Stem Cells* 2007; 25: 3252-3260.
276. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126: 663-676.
277. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007; 318: 1917-1920.
278. Giorgetti A, Montserrat N, Rodriguez-Piza I et al. Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood cells with only two factors: Oct4 and Sox2. *Nat Protoc* 2010; 5: 811-820.
279. Giorgetti A, Montserrat N, Aasen T et al. Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood using OCT4 and SOX2. *Cell Stem Cell* 2009; 5: 353-357.
280. Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K et al. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* 2008; 26: 101-106.
281. Yamanaka S, Blau HM. Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. *Nature* 2010; 465: 704-712.
282. Bayart E, Cohen-Haguenaer O. Technological overview of iPS induction from human adult somatic cells. *Curr Gene Ther* 2013; 13: 73-92.
283. Liu H, Kim Y, Sharkis S et al. In vivo liver regeneration potential of human induced pluripotent stem cells from diverse origins. *Sci Transl Med* 2011; 3: 82ra39.
284. Gai H, Nguyen DM, Moon YJ et al. Generation of murine hepatic lineage cells from induced pluripotent stem cells. *Differentiation* 2010; 79: 171-181.
285. Sullivan GJ, Hay DC, Park IH et al. Generation of functional human hepatic endoderm from human induced pluripotent stem cells. *Hepatology* 2010; 51: 329-335.
286. Gallicano GI, Mishra L. Hepatocytes from induced pluripotent stem cells: a giant leap forward for hepatology. *Hepatology* 2010; 51: 20-22.
287. Sancho-Bru P, Roelandt P, Narain N et al. Directed differentiation of murine-induced pluripotent stem cells to functional hepatocyte-like cells. *J Hepatol* 2011; 54: 98-107.
288. Schwartz RE, Fleming HE, Khetani SR, Bhatia SN. Pluripotent stem cell-derived hepatocyte-like cells. *Biotechnol Adv* 2014; 32: 504-513.
289. Chen AA, Thomas DK, Ong LL et al. Humanized mice with ectopic artificial liver tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 11842-11847.

290. Ma X, Duan Y, Tschudy-Seney B et al. Highly efficient differentiation of functional hepatocytes from human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Transl Med* 2013; 2: 409-419.
291. Zhu S, Rezvani M, Harbell J et al. Mouse liver repopulation with hepatocytes generated from human fibroblasts. *Nature* 2014; 508: 93-97.
292. Goodell MA, Brose K, Paradis G et al. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med* 1996; 183: 1797-1806.
293. Petersen BE, Grossbard B, Hatch H et al. Mouse A6-positive hepatic oval cells also express several hematopoietic stem cell markers. *Hepatology* 2003; 37: 632-640.
294. Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R et al. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 2000; 32: 11-16.
295. Petersen BE, Zajac VF, Michalopoulos GK. Hepatic oval cell activation in response to injury following chemically induced periportal or pericentral damage in rats. *Hepatology* 1998; 27: 1030-1038.
296. Austin TW, Lagasse E. Hepatic regeneration from hematopoietic stem cells. *Mech Dev* 2003; 120: 131-135.
297. Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 2000; 6: 1229-1234.
298. Vassilopoulos G, Wang PR, Russell DW. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* 2003; 422: 901-904.
299. Jang YY, Collector MI, Baylin SB et al. Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion. *Nat Cell Biol* 2004; 6: 532-539.
300. Newsome PN, Johannessen I, Boyle S et al. Human cord blood-derived cells can differentiate into hepatocytes in the mouse liver with no evidence of cellular fusion. *Gastroenterology* 2003; 124: 1891-1900.
301. Almeida-Porada G, Porada CD, Chamberlain J et al. Formation of human hepatocytes by human hematopoietic stem cells in sheep. *Blood* 2004; 104: 2582-2590.
302. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 1976; 4: 267-274.
303. Pereira RF, O'Hara MD, Laptev AV et al. Marrow stromal cells as a source of progenitor cells for nonhematopoietic tissues in transgenic mice with a phenotype of osteogenesis imperfecta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 1142-1147.
304. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997; 276: 71-74.
305. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for continual renewal of nonhematopoietic tissues and as potential vectors for gene therapy. *J Cell Biochem Suppl* 1998; 30-31: 284-285.
306. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284: 143-147.
307. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8: 315-317.
308. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2005; 7: 393-395.
309. Tondreau T, Meuleman N, Delforge A et al. Mesenchymal stem cells derived from CD133-positive cells in mobilized peripheral blood and cord blood: proliferation, Oct4 expression, and plasticity. *Stem Cells* 2005; 23: 1105-1112.

310. Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 3213-3218.
311. Muraglia A, Cancedda R, Quarto R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J Cell Sci* 2000; 113 (Pt 7): 1161-1166.
312. in 't Anker PS, Noort WA, Scherjon SA et al. Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential. *Haematologica* 2003; 88: 845-852.
313. Guillot PV, Gotherstrom C, Chan J et al. Human first-trimester fetal MSC express pluripotency markers and grow faster and have longer telomeres than adult MSC. *Stem Cells* 2007; 25: 646-654.
314. Herrera MB, Bruno S, Buttiglieri S et al. Isolation and characterization of a stem cell population from adult human liver. *Stem Cells* 2006; 24: 2840-2850.
315. Najimi M, Khuu DN, Lysy PA et al. Adult-derived human liver mesenchymal-like cells as a potential progenitor reservoir of hepatocytes? *Cell Transplant* 2007; 16: 717-728.
316. Noel D, Caton D, Roche S et al. Cell specific differences between human adipose-derived and mesenchymal-stromal cells despite similar differentiation potentials. *Exp Cell Res* 2008; 314: 1575-1584.
317. Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S et al. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood* 2001; 98: 2396-2402.
318. Oertel M. Fetal liver cell transplantation as a potential alternative to whole liver transplantation? *J Gastroenterol* 2011; 46: 953-965.
319. Gotherstrom C, Ringden O, Westgren M et al. Immunomodulatory effects of human foetal liver-derived mesenchymal stem cells. *Bone Marrow Transplant* 2003; 32: 265-272.
320. Dan YY, Riehle KJ, Lazaro C et al. Isolation of multipotent progenitor cells from human fetal liver capable of differentiating into liver and mesenchymal lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 9912-9917.
321. Zhang W HZ, Pourcher G, Gribova V, Haghighi F, Candelier JJ, Charbord P and Dubart-Kupperschmitt A. A Population of Human Mesenchymal Stem Cells Specific to the Fetal Liver Development. *Journal of Stem Cell Research & Therapy* 2014; *J Stem Cell Res Ther* 4: 23.
322. Snykers S, De Kock J, Tamara V, Rogiers V. Hepatic differentiation of mesenchymal stem cells: in vitro strategies. *Methods Mol Biol* 2011; 698: 305-314.
323. Sekiya S, Suzuki A. Direct conversion of mouse fibroblasts to hepatocyte-like cells by defined factors. *Nature* 2011; 475: 390-393.
324. Huang P, He Z, Ji S et al. Induction of functional hepatocyte-like cells from mouse fibroblasts by defined factors. *Nature* 2011; 475: 386-389.
325. Huang P, Zhang L, Gao Y et al. Direct reprogramming of human fibroblasts to functional and expandable hepatocytes. *Cell Stem Cell* 2014; 14: 370-384.
326. Du Y, Wang J, Jia J et al. Human hepatocytes with drug metabolic function induced from fibroblasts by lineage reprogramming. *Cell Stem Cell* 2014; 14: 394-403.
327. Simeonov KP, Uppal H. Direct reprogramming of human fibroblasts to hepatocyte-like cells by synthetic modified mRNAs. *PLoS One* 2014; 9: e100134.
328. Gupta S, Rajvanshi P, Sokhi R et al. Entry and integration of transplanted hepatocytes in rat liver plates occur by disruption of hepatic sinusoidal endothelium. *Hepatology* 1999; 29: 509-519.
329. Benten D, Follenzi A, Bhargava KK et al. Hepatic targeting of transplanted liver sinusoidal endothelial cells in intact mice. *Hepatology* 2005; 42: 140-148.

330. Gupta S, Yerneni PR, Vemuru RP et al. Studies on the safety of intrasplenic hepatocyte transplantation: relevance to ex vivo gene therapy and liver repopulation in acute hepatic failure. *Hum Gene Ther* 1993; 4: 249-257.
331. Rajvanshi P, Kerr A, Bhargava KK et al. Efficacy and safety of repeated hepatocyte transplantation for significant liver repopulation in rodents. *Gastroenterology* 1996; 111: 1092-1102.
332. Ohashi K, Waugh JM, Dake MD et al. Liver tissue engineering at extrahepatic sites in mice as a potential new therapy for genetic liver diseases. *Hepatology* 2005; 41: 132-140.
333. Ohashi K, Yokoyama T, Yamato M et al. Engineering functional two- and three-dimensional liver systems in vivo using hepatic tissue sheets. *Nat Med* 2007; 13: 880-885.
334. Tatsumi K, Ohashi K, Shima M et al. Therapeutic effects of hepatocyte transplantation on hemophilia B. *Transplantation* 2008; 86: 167-170.
335. Diehl AM. Nutrition, hormones, metabolism, and liver regeneration. *Semin Liver Dis* 1991; 11: 315-320.
336. Jones BE, Czaja MJ. III. Intracellular signaling in response to toxic liver injury. *Am J Physiol* 1998; 275: G874-878.
337. Nostrant TT, Miller DL, Appelman HD, Gumucio JJ. Acinar distribution of liver cell regeneration after selective zonal injury in the rat. *Gastroenterology* 1978; 75: 181-186.
338. Brucoleri A, Gallucci R, Germolec DR et al. Induction of early-immediate genes by tumor necrosis factor alpha contribute to liver repair following chemical-induced hepatotoxicity. *Hepatology* 1997; 25: 133-141.
339. Yazigi NA, Carrick TL, Bucuvalas JC et al. Expansion of transplanted hepatocytes during liver regeneration. *Transplantation* 1997; 64: 816-820.
340. Liu KX, Kato Y, Yamazaki M et al. Decrease in the hepatic clearance of hepatocyte growth factor in carbon tetrachloride-intoxicated rats. *Hepatology* 1993; 17: 651-660.
341. Rozga J. Extracorporeal support of the failing liver. *Med Sci Monit* 2001; 7 Suppl 1: 78-90.
342. Lindroos PM, Zarnegar R, Michalopoulos GK. Hepatocyte growth factor (hepatopoietin A) rapidly increases in plasma before DNA synthesis and liver regeneration stimulated by partial hepatectomy and carbon tetrachloride administration. *Hepatology* 1991; 13: 743-750.
343. Alp MH, Hickman R. The effect of prostaglandins, branched-chain amino acids and other drugs on the outcome of experimental acute porcine hepatic failure. *J Hepatol* 1987; 4: 99-107.
344. Kobayashi N, Ito M, Nakamura J et al. Hepatocyte transplantation in rats with decompensated cirrhosis. *Hepatology* 2000; 31: 851-857.
345. Kobayashi N, Ito M, Nakamura J et al. Hepatocyte transplantation improves liver function and prolongs survival in rats with decompensated liver cirrhosis. *Transplant Proc* 1999; 31: 428-429.
346. Decker K, Keppler D. Galactosamine induced liver injury. *Prog Liver Dis* 1972; 4: 183-199.
347. Baumgartner D, LaPlante-O'Neill PM, Sutherland DE, Najarian JS. Effects of intrasplenic injection of hepatocytes, hepatocyte fragments and hepatocyte culture supernatants on D-galactosamine-induced liver failure in rats. *Eur Surg Res* 1983; 15: 129-135.
348. Grun M, Liehr H, Rasenack U. Significance of endotoxaemia in experimental "galactosamine-hepatitis" in the rat. *Acta Hepatogastroenterol (Stuttg)* 1977; 24: 64-81.
349. Blitzer BL, Waggoner JG, Jones EA et al. A model of fulminant hepatic failure in the rabbit. *Gastroenterology* 1978; 74: 664-671.
350. Tracy TF, Jr., Bailey PV, Goerke ME et al. Cholestasis without cirrhosis alters regulatory liver gene expression and inhibits hepatic regeneration. *Surgery* 1991; 110: 176-182; discussion 182-173.

351. Albrecht J, Hilgier W. Arginine in thioacetamide-induced hepatogenic encephalopathy in rats: activation of enzymes of arginine metabolism to glutamate. *Acta Neurol Scand* 1986; 73: 498-501.
352. Maddison JE, Dodd PR, Johnston GA, Farrell GC. Brain gamma-aminobutyric acid receptor binding is normal in rats with thioacetamide-induced hepatic encephalopathy despite elevated plasma gamma-aminobutyric acid-like activity. *Gastroenterology* 1987; 93: 1062-1068.
353. Bolesta S, Haber SL. Hepatotoxicity associated with chronic acetaminophen administration in patients without risk factors. *Ann Pharmacother* 2002; 36: 331-333.
354. Rahman TM, Hodgson HJ. Animal models of acute hepatic failure. *Int J Exp Pathol* 2000; 81: 145-157.
355. Zieve L, Anderson WR, Dozeman R et al. Acetaminophen liver injury: sequential changes in two biochemical indices of regeneration and their relationship to histologic alterations. *J Lab Clin Med* 1985; 105: 619-624.
356. Leonard TB, Morgan DG, Dent JG. Ranitidine-acetaminophen interaction: effects on acetaminophen-induced hepatotoxicity in Fischer 344 rats. *Hepatology* 1985; 5: 480-487.
357. Francavilla A, Makowka L, Polimeno L et al. A dog model for acetaminophen-induced fulminant hepatic failure. *Gastroenterology* 1989; 96: 470-478.
358. Miller DJ, Hickman R, Fratter R et al. An animal model of fulminant hepatic failure: a feasibility study. *Gastroenterology* 1976; 71: 109-113.
359. Morales-Gonzalez JA, Gutierrez-Salinas J, Yanez L et al. Morphological and biochemical effects of a low ethanol dose on rat liver regeneration: role of route and timing of administration. *Dig Dis Sci* 1999; 44: 1963-1974.
360. Akerman PA, Cote PM, Yang SQ et al. Long-term ethanol consumption alters the hepatic response to the regenerative effects of tumor necrosis factor-alpha. *Hepatology* 1993; 17: 1066-1073.
361. Frank WO, Rayyes AN, Washington A, Holt PR. Effect of acute ethanol administration upon hepatic regeneration. *J Lab Clin Med* 1979; 93: 402-413.
362. Orrego H, Crossley IR, Saldivia V et al. Long-term ethanol administration and short- and long-term liver regeneration after partial hepatectomy. *J Lab Clin Med* 1981; 97: 221-230.
363. Diehl AM, Chacon M, Wagner P. The effect of chronic ethanol feeding on ornithine decarboxylase activity and liver regeneration. *Hepatology* 1988; 8: 237-242.
364. Zhou XF, Wang Q, Chu JX, Liu AL. Effects of retrorsine on mouse hepatocyte proliferation after liver injury. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1439-1442.
365. Guo D, Fu T, Nelson JA et al. Liver repopulation after cell transplantation in mice treated with retrorsine and carbon tetrachloride. *Transplantation* 2002; 73: 1818-1824.
366. Oren R, Dabeva MD, Karnezis AN et al. Role of thyroid hormone in stimulating liver repopulation in the rat by transplanted hepatocytes. *Hepatology* 1999; 30: 903-913.
367. Ichinohe N, Kon J, Sasaki K et al. Growth ability and repopulation efficiency of transplanted hepatic stem cells, progenitor cells, and mature hepatocytes in retrorsine-treated rat livers. *Cell Transplant* 2012; 21: 11-22.
368. Liu XL, Li LJ, Chen Z. Isolation and primary culture of rat hepatocytes. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2002; 1: 77-79.
369. Voros K, Albert M, Vetesi F et al. Hepatic ultrasonographic findings in experimental carbon tetrachloride intoxication of the dog. *Acta Vet Hung* 1997; 45: 137-150.
370. Kawakami S, Tsubouchi H, Nakagawa S et al. Expression of hepatocyte growth factor in normal and carbon tetrachloride-treated monkeys. *Hepatology* 1994; 20: 1255-1260.
371. Picard C, Lambotte L, Starkel P et al. Retrorsine: a kinetic study of its influence on rat liver regeneration in the portal branch ligation model. *J Hepatol* 2003; 39: 99-105.

372. Koniaris LG, Zimmers-Koniaris T, Hsiao EC et al. Cytokine-responsive gene-2/IFN-inducible protein-10 expression in multiple models of liver and bile duct injury suggests a role in tissue regeneration. *J Immunol* 2001; 167: 399-406.
373. Diaz-Buxo JA, Blumenthal S, Hayes D et al. Galactosamine-induced fulminant hepatic necrosis in unanesthetized canines. *Hepatology* 1997; 25: 950-957.
374. Ho CM, Dhawan A, Hughes RD et al. Use of indocyanine green for functional assessment of human hepatocytes for transplantation. *Asian J Surg* 2012; 35: 9-15.
375. Metzner C, Hartig W, Matkowitz R et al. [Value of various amino acid mixtures for the treatment of chronic liver damage]. *Infusionsther Klin Ernahr* 1987; 14: 256-260.
376. Gardner CR, Laskin JD, Dambach DM et al. Reduced hepatotoxicity of acetaminophen in mice lacking inducible nitric oxide synthase: potential role of tumor necrosis factor- α and interleukin-10. *Toxicol Appl Pharmacol* 2002; 184: 27-36.
377. Shakoori AR, Cheema IA, Rani A, Ali SS. Evaluation of liver function after thioacetamide treatment of partially hepatectomized rabbits. *Acta Physiol Pharmacol Latinoam* 1984; 34: 301-312.
378. Columbano A, Shinozuka H. Liver regeneration versus direct hyperplasia. *FASEB J* 1996; 10: 1118-1128.
379. Kubo Y, Yasunaga M, Masuhara M et al. Hepatocyte proliferation induced in rats by lead nitrate is suppressed by several tumor necrosis factor α inhibitors. *Hepatology* 1996; 23: 104-114.
380. Ledda-Columbano GM, Columbano A, Cannas A et al. Dexamethasone inhibits induction of liver tumor necrosis factor- α mRNA and liver growth induced by lead nitrate and ethylene dibromide. *Am J Pathol* 1994; 145: 951-958.
381. De Vree JM, Ottenhoff R, Bosma PJ et al. Correction of liver disease by hepatocyte transplantation in a mouse model of progressive familial intrahepatic cholestasis. *Gastroenterology* 2000; 119: 1720-1730.
382. Overturf K, Al-Dhalimy M, Manning K et al. Ex vivo hepatic gene therapy of a mouse model of Hereditary Tyrosinemia Type I. *Hum Gene Ther* 1998; 9: 295-304.
383. Grompe M. Complete hepatic regeneration after somatic deletion of an albumin-plasminogen activator transgene. 1991. *J Hepatol* 2002; 37: 422-424.
384. Malhi H, Gorla GR, Irani AN et al. Cell transplantation after oxidative hepatic preconditioning with radiation and ischemia-reperfusion leads to extensive liver repopulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 13114-13119.
385. Yamanouchi K, Zhou H, Roy-Chowdhury N et al. Hepatic irradiation augments engraftment of donor cells following hepatocyte transplantation. *Hepatology* 2009; 49: 258-267.
386. Koenig S, Krause P, Schmidt TK et al. Irradiation as preparative regimen for hepatocyte transplantation causes prolonged cell cycle block. *Int J Radiat Biol* 2008; 84: 285-298.
387. Koenig S, Yuan Q, Krause P et al. Regional transient portal ischemia and irradiation as preparative regimen for hepatocyte transplantation. *Cell Transplant* 2011; 20: 303-311.
388. Sempoux C, Horsmans Y, Geubel A et al. Severe radiation-induced liver disease following localized radiation therapy for biliopancreatic carcinoma: activation of hepatic stellate cells as an early event. *Hepatology* 1997; 26: 128-134.
389. Higgins G, Anderson RM. . Experimental pathology of the liver: restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol* 1931; 12: 186-202.
390. Lehmann K, Tschuor C, Rickenbacher A et al. Liver failure after extended hepatectomy in mice is mediated by a p21-dependent barrier to liver regeneration. *Gastroenterology* 2012; 143: 1609-1619 e1604.
391. Yoshimura S, Kamada N. Effect of cyclosporin A on liver regeneration following partial hepatectomy in the mouse. *Transplant Proc* 1989; 21: 911-912.

392. Faktor VM, Uryvaeva IV, Sokolova AS et al. Kinetics of cellular proliferation in regenerating mouse liver pretreated with the alkylating drug dipin. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1980; 33: 187-197.
393. Fabrikant JI. The kinetics of cellular proliferation in regenerating liver. *J Cell Biol* 1968; 36: 551-565.
394. Frerichs F. Hospital of liver disease. Braunschweig edition 1861.
395. Aussilhou B, Lesurtel M, Sauvanet A et al. Right portal vein ligation is as efficient as portal vein embolization to induce hypertrophy of the left liver remnant. *J Gastrointest Surg* 2008; 12: 297-303.
396. Denys AL, Abehsera M, Sauvanet A et al. Failure of right portal vein ligation to induce left lobe hypertrophy due to intrahepatic portoportal collaterals: successful treatment with portal vein embolization. *AJR Am J Roentgenol* 1999; 173: 633-635.
397. Eguchi S, Rozga J, Lebow LT et al. Treatment of hypercholesterolemia in the Watanabe rabbit using allogeneic hepatocellular transplantation under a regeneration stimulus. *Transplantation* 1996; 62: 588-593.
398. Kocken JM, Borel Rinkes IH, Bijma AM et al. Correction of an inborn error of metabolism by intraportal hepatocyte transplantation in a dog model. *Transplantation* 1996; 62: 358-364.
399. Ilan Y, Roy-Chowdhury N, Prakash R et al. Massive repopulation of rat liver by transplantation of hepatocytes into specific lobes of the liver and ligation of portal vein branches to other lobes. *Transplantation* 1997; 64: 8-13.
400. Lorand I, Vons C, Nguyen T et al. Portal branch ligation induces efficient retrovirus-mediated gene delivery in rat liver. *J Gene Med* 2004; 6: 507-513.
401. Vons C, Loux N, Simon L et al. Transplantation of hepatocytes in nonhuman primates: a preclinical model for the treatment of hepatic metabolic diseases. *Transplantation* 2001; 72: 811-818.
402. Imamura H, Shimada R, Kubota M et al. Preoperative portal vein embolization: an audit of 84 patients. *Hepatology* 1999; 29: 1099-1105.
403. Farges O, Belghiti J, Kianmanesh R et al. Portal vein embolization before right hepatectomy: prospective clinical trial. *Ann Surg* 2003; 237: 208-217.
404. Pommier R, Ronot M, Cauchy F et al. Colorectal liver metastases growth in the embolized and non-embolized liver after portal vein embolization: influence of initial response to induction chemotherapy. *Ann Surg Oncol* 2014; 21: 3077-3083.
405. Dagher I, Nguyen TH, Groyer-Picard MT et al. Efficient hepatocyte engraftment and long-term transgene expression after reversible portal embolization in nonhuman primates. *Hepatology* 2009; 49: 950-959.
406. Lainas P, Boudechiche L, Osorio A et al. Liver regeneration and recanalization time course following reversible portal vein embolization. *J Hepatol* 2008; 49: 354-362.
407. Bosch A, McCray PB, Jr., Chang SM et al. Proliferation induced by keratinocyte growth factor enhances in vivo retroviral-mediated gene transfer to mouse hepatocytes. *J Clin Invest* 1996; 98: 2683-2687.
408. Patijn GA, Lieber A, Schowalter DB et al. Hepatocyte growth factor induces hepatocyte proliferation in vivo and allows for efficient retroviral-mediated gene transfer in mice. *Hepatology* 1998; 28: 707-716.
409. Kosai KI, Finegold MJ, Thi-Huynh BT et al. Retrovirus-mediated in vivo gene transfer in the replicating liver using recombinant hepatocyte growth factor without liver injury or partial hepatectomy. *Hum Gene Ther* 1998; 9: 1293-1301.
410. Ueno S, Aikou T, Tanabe G et al. Exogenous hepatocyte growth factor markedly stimulates liver regeneration following portal branch ligation in dogs. *Cancer Chemother Pharmacol* 1996; 38: 233-237.

411. Krohn N, Kapoor S, Enami Y et al. Hepatocyte transplantation-induced liver inflammation is driven by cytokines-chemokines associated with neutrophils and Kupffer cells. *Gastroenterology* 2009; 136: 1806-1817.
412. Bahde R, Kapoor S, Bandi S et al. Directly acting drugs prostacyclin or nitroglycerine and endothelin receptor blocker bosentan improve cell engraftment in rodent liver. *Hepatology* 2013; 57: 320-330.
413. Slehria S, Rajvanshi P, Ito Y et al. Hepatic sinusoidal vasodilators improve transplanted cell engraftment and ameliorate microcirculatory perturbations in the liver. *Hepatology* 2002; 35: 1320-1328.
414. Boudechiche L, Tranchart H, Branchereau S et al. Improvement of Hepatocyte Transplantation Efficiency in the *mdr2*^{-/-} Mouse Model by Glyceryl Trinitrate. *Transplantation* 2014.
415. Joseph B, Malhi H, Bhargava KK et al. Kupffer cells participate in early clearance of syngeneic hepatocytes transplanted in the rat liver. *Gastroenterology* 2002; 123: 1677-1685.
416. Enami Y, Bandi S, Kapoor S et al. Hepatic stellate cells promote hepatocyte engraftment in rat liver after prostaglandin-endoperoxide synthase inhibition. *Gastroenterology* 2009; 136: 2356-2364.
417. Schu S, Nosov M, O'Flynn L et al. Immunogenicity of allogeneic mesenchymal stem cells. *J Cell Mol Med* 2012; 16: 2094-2103.
418. Stephenne X, Vosters O, Najimi M et al. Tissue factor-dependent procoagulant activity of isolated human hepatocytes: relevance to liver cell transplantation. *Liver Transpl* 2007; 13: 599-606.
419. Kim KS, Joseph B, Inada M, Gupta S. Regulation of hepatocyte engraftment and proliferation after cytotoxic drug-induced perturbation of the rat liver. *Transplantation* 2005; 80: 653-659.
420. Gupta S, Bhargava KK, Novikoff PM. Mechanisms of cell engraftment during liver repopulation with hepatocyte transplantation. *Semin Liver Dis* 1999; 19: 15-26.
421. Sokal EM, Smets F, Bourgois A et al. Hepatocyte transplantation in a 4-year-old girl with peroxisomal biogenesis disease: technique, safety, and metabolic follow-up. *Transplantation* 2003; 76: 735-738.
422. Kamimura R, Ishii T, Sasaki N et al. Comparative study of transplantation of hepatocytes at various differentiation stages into mice with lethal liver damage. *Cell Transplant* 2012; 21: 2351-2362.
423. Dutkowski P, De Rougemont O, Mullhaupt B, Clavien PA. Current and future trends in liver transplantation in Europe. *Gastroenterology* 2010; 138: 802-809 e801-804.
424. Brouquet A, Belghiti J. Chemotherapy and its effect on liver hypertrophy: implications for portal vein embolization and resection. *Semin Intervent Radiol* 2008; 25: 162-167.
425. Pourcher GE-K, H.; Kanso, F.; Groyer-Picard, MT.; Trassard, O.; Blazsek, I.; Agostini, H.; Dubart-Kupperschmitt, A.; Dagher, I. Volumetric portal embolization: a new concept to improve liver regeneration and hepatocyte engraftment. *Transplantation* 2015.
426. Fausto N. Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells, and stem cells. *Hepatology* 2004; 39: 1477-1487.
427. Fausto N, Riehle KJ. Mechanisms of liver regeneration and their clinical implications. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2005; 12: 181-189.
428. Alison MR, Choong C, Lim S. Application of liver stem cells for cell therapy. *Semin Cell Dev Biol* 2007; 18: 819-826.
429. Qiao H, Tong Y, Han H et al. A novel therapeutic regimen for hepatic fibrosis using the combination of mesenchymal stem cells and baicalin. *Pharmazie* 2011; 66: 37-43.
430. Zhou P, Wirthlin L, McGee J et al. Contribution of human hematopoietic stem cells to liver repair. *Semin Immunopathol* 2009; 31: 411-419.

431. Yagi H, Parekkadan B, Suganuma K et al. Long-term superior performance of a stem cell/hepatocyte device for the treatment of acute liver failure. *Tissue Eng Part A* 2009; 15: 3377-3388.
432. Jin SZ, Meng XW, Han MZ et al. Stromal cell derived factor-1 enhances bone marrow mononuclear cell migration in mice with acute liver failure. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 2657-2664.
433. Salama H, Zekri AR, Zern M et al. Autologous hematopoietic stem cell transplantation in 48 patients with end-stage chronic liver diseases. *Cell Transplant* 2010; 19: 1475-1486.
434. Lorenzini S, Bird TG, Boulter L et al. Characterisation of a stereotypical cellular and extracellular adult liver progenitor cell niche in rodents and diseased human liver. *Gut* 2010; 59: 645-654.
435. Piscaglia AC, Campanale M, Gasbarrini A, Gasbarrini G. Stem cell-based therapies for liver diseases: state of the art and new perspectives. *Stem Cells Int* 2010; 2010: 259461.
436. Ghodsizadeh A, Taei A, Totonchi M et al. Generation of liver disease-specific induced pluripotent stem cells along with efficient differentiation to functional hepatocyte-like cells. *Stem Cell Rev* 2010; 6: 622-632.
437. Fox IJ, Strom SC. To be or not to be: generation of hepatocytes from cells outside the liver. *Gastroenterology* 2008; 134: 878-881.
438. Alison MR, Murphy G, Leedham S. Stem cells and cancer: a deadly mix. *Cell Tissue Res* 2008; 331: 109-124.
439. D'Ippolito G, Schiller PC, Ricordi C et al. Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. *J Bone Miner Res* 1999; 14: 1115-1122.
440. Gotherstrom C, West A, Liden J et al. Difference in gene expression between human fetal liver and adult bone marrow mesenchymal stem cells. *Haematologica* 2005; 90: 1017-1026.
441. Blazsek I, Clay D, Leclerc P et al. Purification and processing of blood-forming tissue units, the haematoms, in searching for mammalian stem cell niches. In *Protocol exchange*. Nature .com Nature .com 2013.
442. Lai RC, Arslan F, Tan SS et al. Derivation and characterization of human fetal MSCs: an alternative cell source for large-scale production of cardioprotective microparticles. *J Mol Cell Cardiol* 2010; 48: 1215-1224.
443. Block GD, Locker J, Bowen WC et al. Population expansion, clonal growth, and specific differentiation patterns in primary cultures of hepatocytes induced by HGF/SF, EGF and TGF alpha in a chemically defined (HGM) medium. *J Cell Biol* 1996; 132: 1133-1149.
444. Elaut G, Henkens T, Papeleu P et al. Molecular mechanisms underlying the dedifferentiation process of isolated hepatocytes and their cultures. *Curr Drug Metab* 2006; 7: 629-660.
445. Mitaka T, Sato F, Mizuguchi T et al. Reconstruction of hepatic organoid by rat small hepatocytes and hepatic nonparenchymal cells. *Hepatology* 1999; 29: 111-125.
446. Najimi M, Smets F, Sokal E. Hepatocyte apoptosis. *Methods Mol Biol* 2009; 481: 59-74.
447. Stephenne X, Najimi M, Sokal EM. Hepatocyte cryopreservation: is it time to change the strategy? *World J Gastroenterol* 2010; 16: 1-14.
448. Yang G, Si-Tayeb K, Corbineau S et al. Integration-deficient lentivectors: an effective strategy to purify and differentiate human embryonic stem cell-derived hepatic progenitors. *BMC Biol* 2013; 11: 86.
449. Tolosa LC, J; Hannoun, S; Antoni, M; Lopez, S; Burks, D; Castell, JV; Weber, A; Gomez-Lechon, MJ; Dubart-Kupperschmitt, A. Transplantation of hESC-derived hepatocytes protects mice from liver injury. *Stem Cell Research & Therapy* 2015.

450. Campard D, Lysy PA, Najimi M, Sokal EM. Native umbilical cord matrix stem cells express hepatic markers and differentiate into hepatocyte-like cells. *Gastroenterology* 2008; 134: 833-848.
451. Khuu DN, Najimi M, Sokal EM. Epithelial cells with hepatobiliary phenotype: is it another stem cell candidate for healthy adult human liver? *World J Gastroenterol* 2007; 13: 1554-1560.
452. Khuu DN, Scheers I, Ehnert S et al. In vitro differentiated adult human liver progenitor cells display mature hepatic metabolic functions: a potential tool for in vitro pharmacotoxicological testing. *Cell Transplant* 2011; 20: 287-302.
453. Lysy PA, Campard D, Smets F et al. Persistence of a chimerical phenotype after hepatocyte differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Prolif* 2008; 41: 36-58.
454. Stock P, Bruckner S, Winkler S et al. Human bone marrow mesenchymal stem cell-derived hepatocytes improve the mouse liver after acute acetaminophen intoxication by preventing progress of injury. *Int J Mol Sci* 2014; 15: 7004-7028.
455. Djouad F, Bony C, Haupl T et al. Transcriptional profiles discriminate bone marrow-derived and synovium-derived mesenchymal stem cells. *Arthritis Res Ther* 2005; 7: R1304-1315.
456. Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, Muneta T. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 2521-2529.
457. Shirasawa S, Sekiya I, Sakaguchi Y et al. In vitro chondrogenesis of human synovium-derived mesenchymal stem cells: optimal condition and comparison with bone marrow-derived cells. *J Cell Biochem* 2006; 97: 84-97.
458. El Kehdy HP, G; Zhang, W; Hamidouche, Z; Goulinet-Mainot, S; Sokal, E; Charbord, P; Najimi, M; Dubart-Kupperschmitt, A. Hepatocytic differentiation potential of human fetal liver Mesenchymal Stem Cells: in vitro and in vivo evaluation. *Stem Cells International* 2015.
459. Aurich H, Sgodda M, Kaltwasser P et al. Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from human adipose tissue in vitro promotes hepatic integration in vivo. *Gut* 2009; 58: 570-581.
460. Puppi J, Dhawan A. Human hepatocyte transplantation overview. *Methods Mol Biol* 2009; 481: 1-16.
461. Van de Casteele M, Sagesser H, Zimmermann H, Reichen J. Characterisation of portal hypertension models by microspheres in anaesthetised rats: a comparison of liver flow. *Pharmacol Ther* 2001; 90: 35-43.
462. Hammad S, Hoehme S, Friebe A et al. Protocols for staining of bile canaliculi and sinusoidal networks of human, mouse and pig livers, three-dimensional reconstruction and quantification of tissue microarchitecture by image processing and analysis. *Arch Toxicol* 2014; 88: 1161-1183.
463. Wisse E, Jacobs F, Topal B et al. The size of endothelial fenestrae in human liver sinusoids: implications for hepatocyte-directed gene transfer. *Gene Ther* 2008; 15: 1193-1199.
464. Grossman HJ, Grossman VL, Bhathal PS. Hemodynamic characteristics of the intrahepatic portal vascular bed over an extended flow range: a study in the isolated perfused rat liver. *Hepatology* 1995; 21: 162-168.
465. Furrer K, Tian Y, Pfammatter T et al. Selective portal vein embolization and ligation trigger different regenerative responses in the rat liver. *Hepatology* 2008; 47: 1615-1623.
466. Vanheule E, Fan YD, Van Huysse J et al. Expression of placental growth factor in regenerating livers after partial hepatectomy in the rat. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2011; 23: 66-75.

467. Huisman F, van Lienden KP, Damude S et al. A review of animal models for portal vein embolization. *J Surg Res* 2014; 191: 179-188.
468. Hightower MJ, Fairfield FR, Lucas JJ. A staining procedure for identifying viable cell hybrids constructed by somatic cell fusion, cybridization, or nuclear transplantation. *Somatic Cell Genet* 1981; 7: 321-329.
469. Uchida N, Fujisaki T, Eaves AC, Eaves CJ. Transplantable hematopoietic stem cells in human fetal liver have a CD34(+) side population (SP) phenotype. *J Clin Invest* 2001; 108: 1071-1077.
470. Kalchenko V, Shivtiel S, Malina V et al. Use of lipophilic near-infrared dye in whole-body optical imaging of hematopoietic cell homing. *J Biomed Opt* 2006; 11: 050507.
471. Fitzpatrick E, Mitry RR, Dhawan A. Human hepatocyte transplantation: state of the art. *J Intern Med* 2009; 266: 339-357.
472. Heinrich S, Jochum W, Graf R, Clavien PA. Portal vein ligation and partial hepatectomy differentially influence growth of intrahepatic metastasis and liver regeneration in mice. *J Hepatol* 2006; 45: 35-42.
473. Strom SC, Jirtle RL, Jones RS et al. Isolation, culture, and transplantation of human hepatocytes. *J Natl Cancer Inst* 1982; 68: 771-778.

8. ANNEXES

Annexe 1 : Curriculum vitae



Guillaume POURCHER

guillaume.pourcher@aphp.fr

guillaumepourcher@gmail.com

Né le 08 /09/1975

-Nationalité Française

-Situation familiale : Marié

-Tel: 06.34.87.80.42

-Domicile :

9 rue Romain Rolland 94250 Gentilly

Numéro Conseil de l'ordre des médecins : 92/20694

Numéro RPPS : 10005185193

Numéro ADELI : 921206942

-Adresses professionnelles :

1- Service de chirurgie digestive minimale invasive, Hôpital Antoine Béchère

Assistance Publique des hôpitaux de Paris,

Faculté de Médecine, Paris XI

157 rue de la porte de Trivaux 92141 Clamart

2- Laboratoire INSERM U 1193, Bâtiment Lavoisier*

Hôpital Paul Brousse

12 avenue Paul Vaillant Couturier, 94807 Villejuif Cedex

DIPLOMES ET TITRES UNIVERSITAIRES

- 2015** **Diplôme de Doctorat en Sciences, Université Paris Sud:** Ecole doctorale ED425 (Innovations thérapeutiques: du fondamental à l'appliqué). Amélioration des résultats de la thérapie cellulaire hépatique dans des modèles précliniques (Directeurs: Pr I. Dagher et Dr A. Dubart-Kupperschmitt)
- 2014** **Diplôme Inter-universitaire de chirurgie de l'obésité,** Université Paris Diderot - Paris 7
- 2012** **Réussite au Concours de Praticien Hospitalier spécialité chirurgie générale**
- 2011** **Requalification ordinale en chirurgie générale**
- 2010** **Diplôme universitaire d'Expérimentation animale de niveau I,** Inserm/ParisV
- 2010** **Diplôme d'Etudes Spécialisées Complémentaires en Cancérologie - DESC** (Groupe I), Faculté de Reims, Champagne Ardennes
- 2008** **Diplôme de Doctorat en Médecine,** Faculté de Reims, Champagne Ardennes
- 2008** **Diplôme d'Etudes Spécialisées en Gynéco-Obstétrique - DES** (Hôpitaux de Reims).
- 2008** **Diplôme Inter-universitaire de chirurgie coelioscopique avancée** (Pr Franco, Université Paris XI)
- 2007** **Master II: Relation Hôte-Greffon** (Pr Hervé, Faculté de Besançon), réalisé dans le laboratoire INSERM, UMR_S 893, Prolifération and differentiation of stem cells, Hôpital St Antoine, Paris V, mention Assez Bien
- 2007** **Licence de Philosophie,** Paris I, Faculté La Sorbonne

- 2005** **Diplôme universitaire de pathologie mammaire** (Pr Ville, CRH St Cloud),
UFR Paris Ile de France Ouest
- 2002** **Concours d'Internat:** admis en filière de Spécialité en gynécologie-obstétrique,
Champagne Ardennes, Reims
- 2000** **Maîtrise de Sciences biologiques et médicales**, Université Lyon I, Mention
Assez Bien
- 2000** **Certificat C2** d'embryologie, mention Assez Bien (Pr. Guérin)
- 1999** **Certificat C1** d'anatomie-physiologie, mention Assez Bien (Pr. Morin)
- 1995-2002** **Premiers et deuxièmes cycles** des études médicales, Faculté de médecine de
Lyon Nord
- 1994** **Baccalauréat** : série C, Externat Sainte-Marie, Académie Lyon, mention Assez
bien

CURSUS MEDICAL

- Juil 2013** **Nomination comme Praticien hospitalier titulaire, Hôpital Béchère (APHP)**
- Juil 2012** **Chirurgien des Hôpitaux de Paris (PH-TP)** dans le service de chirurgie digestive minimale invasive, Hôpital Béchère – Assistance Publique des Hôpitaux de Paris (APHP) –
- Nov 2011 à oct 2012** **Année de mobilité recherche temps plein comme étudiant en thèse de sciences rémunérée par l'INSERM dans l'unité 972** (Les cellules souches de leurs niches à leurs applications thérapeutiques), Dr G. Uzan
Validé par CNU chirurgie viscérale (Pr F. Michot)
- Depuis nov-2009** **Chef de clinique-assistant** en Chirurgie viscérale, CHU Antoine Béchère (APHP), Service Pr I. Dagher, Faculté de Médecine Paris XI
- Nov-2008 à oct-2009** **Praticien Hospitalier** Attaché en Chirurgie viscérale, CHU Antoine Béchère (APHP), Service Pr Franco
- 2009** **Remplacement en chirurgie viscérale** à la clinique des Franciscaines (Versailles)
- 2005-2008** **Remplacement en gynécologie obstétrique** à Troyes
- 2002-2008** **Internat de Spécialités Chirurgicales**, Reims

PUBLICATIONS

Dans des revues internationales avec comité de lecture :

- C. Nelro, A. Lebrun, K. Lamouri, **G. Pourcher**, C. Voican, M. Njike-nguefang, S. Ferreti, R. Courie, H. Tranchart, A. Balian, S. Prevot, G. Perlemuter, I. Dagher, S. Naveau. *Changes in liver stiffness after bariatric surgery in patients with suspected non-alcoholic fatty liver disease and factors explaining these changes*. **Plose One**, soumis 2015

- **G. Pourcher**, S. Ferretti, W. Akakpo, P. Lainas, H. Tranchart, I. Dagher. *Single-port sleeve gastrectomy for super obese patients*. **Surgery Obesity Related Diseases** **2015**, accepté dec 2015

- **G Pourcher**, H. El Kehdy, S. Goulinet-Mainot, M. Najimi, P. Charbord, A. Dubart-Kupperschmitt. *Hepatocytic differentiation potential of human FL-MSc: in vivo and in vitro evaluation*. **Stem Cell International** **2015**, accepté dec 2015

- **G. Pourcher**, H. EL-Kehdy, F. Kanso, MT. Picard , M. gaillard, O. Trassard , I. Blazsek, A. Dubart-Kupperschmitt, I. Dagher. *Volumetric portal embolization: a new concept to improve liver reperation and engraftment of hepatocytes*. **Transplantation** **2015** accepté sept 2015, TPA-2015-0340

- A. Damouche, T. Lazure, N. Huot, N. Dejucq-Rainsford, V. Avettand-Fénoël, A.Satie, A. Mélard, L. David, C. Gommel, J. Ghosn, N. Noel, **G. Pourcher**, V. Martinez, S. Benoist, V. Beréziat, A. Cosma, B. Favier, B. Vaslin, C. Rouzioux, J. Capeau, M. Müller-Trutwin, N. Dereuddre-Bosquet, R. Le Grand, O. Lambotte and C. Bourgeois. *Adipose tissue is a neglected viral reservoir and an inflammatory site during chronic HIV and SIV infection*. **Ploss Pathogens**, 2015 vol. 11(9) : 10051-53

- Ferron G, Simon L, Guyon F, Glehen O, Goere D, Elias D, Pocard M, Gladieff L, Bereder JM, Brigand C, Classe JM, Guilloit JM, Quenet F, Abboud K, Arvieux C, Bibeau F, De Chaisemartin C, Delroeux D, Durand-Fontanier S, Goasguen N, Gouthi L, Heyd B, Kianmanesh R, Leblanc E, Loi V, Lorimier G, Marchal F, Mariani P, Mariette C, Meeus P, Msika S, Ortega-Deballon P, Paineau J, Pezet D, Piessen G, Pirro N, Pomel C, Porcheron J, **Pourcher G**, Rat P, Regimbeau JM, Sabbagh C, Thibaudeau E, Torrent JJ, Tougeron D, Tuech JJ, Zinzindohoue F, Lundberg P, Herin F, Villeneuve L; BIG-RENAPE Working Group. *Professional risks when carrying out cytoreductive surgery for peritoneal malignancy with hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC): A French multicentric survey.* **Eur J Surg Oncol.** 2015 Vol. 41(10) : 1361-7

- GP. De Filippo, **G. Pourcher**, P. Bougneres. *A surgical approach of severe obesity in adolescents.* **Archive de Pédiatrie** 2015 Jul; 22(7): 682-4.

- **G. Pourcher**, D. Costagliola, Martinez V. *Obesity in HIV-infected patients in France: prevalence and surgical procedures.* **Journal of visceral surgery** 2015 Feb; 152(1):33-7

- **G. Pourcher**, GP De Filippo, S. Ferretti, C. Piquard, I. Dagher, P. Bougneres. *Singles port sleeve gastrectomy in adolescents with sévère obesity.* **Surgery Obesity Related Diseases** 2015 Jan-Feb; 11(1): 65-9

- Donatelli G, Dumont JL, Cereatti F, Ferretti S, Vergeau BM, Tuszynski T, **Pourcher G**, Tranchart H, Mariani P, Meduri A, Catheline JM, Dagher I, Fiocca F, Marmuse JP, Meduri B. *Treatment of Leaks Following Sleeve Gastrectomy by Endoscopic Internal Drainage (EID. 2).* **Obesity Surgery**, 2015 Jul; 25(7):1293-301.

- W. Zhang, Z. Hamidouche, **G Pourcher**, et al. *A population of human mesenchymal stem cells specific to the fetal liver development.* **Stem cells Reseach Therapy**, 2014 vol 4: 10-19

- G. Donatelli, S.Ferretti, B.Vergeau, P. Dhumane, JL Dumont, S Derhy, T Tuszynski, S Dritsas, A Carloni, JM Catheline, **G. Pourcher**, I. Dagher, B.

Meduri. *Endoscopic internal Drainage with Enteral Nutrition (EDEN) for treatment of leaks following sleeve gastrectomy*. **Obesity Surgery** 2014 Aug; 24(8):1400-7

- Naveau S, Lamouri K, **Pourcher G**, Njiké-Nakseu M, Ferretti S, Courie R, Tranchart H, Ghinoiu M, Balian A, Prévot S, Perlemuter G, Dagher I. *The Diagnostic Accuracy of Transient Elastography for the Diagnosis of Liver Fibrosis in Bariatric Surgery Candidates with Suspected NAFLD*. **Obesity Surgery** 2014 Oct; 24(10):1693-701.

- Tzanis D, Lainas P, Tranchart H, **Pourcher G**, Devaquet N, Perlemuter G, Naveau S, Dagher I. *Atypical as well as anatomical liver résections are feasible by laparoendoscopic single-incision surgery*. **International Journal of Surgery Case Report** 2014 ; 5(9) : 580-3

- Tranchart H, Lainas P, Tzanis D, Ferretti S, **Pourcher G**, Devaquet N, Dagher I. *Single incision laparoscopic splenectomy with hilar dissection for massive splenomegaly (with video)*. **Journal of visceral surgery** 2014 Apr;151(2):153-4

- H. Tranchart, S. Ketoff, P. Lainas, **G. Pourcher**, E. Giradi, D. Tzanis, S. Ferretti, A. Dautruche, N. Devaquet, I. Dagher. *Single incision laparoscopic cholecystectomy : for what benefit*. **HPB (Oxford)** 2013 Jun; 15(6): 433-8.

- L. Senovilla, I. Vitale, I. Martins, M. Tailler, C. Pailleret, M. Michaud, L. Galluzzi, S. Adjemian, O. Kepp, M. Niso-Santano, S. Shen, G. Mariño, A. Criollo, A. Boilève, B. Job, S. Ladoire, F. Ghiringhelli, A. Sistigu, T. Yamazaki, S. Rello-Varona, C. Locher, V. Poirier-Colame, M. Talbot, A. Valent, F. Berardinelli, A. Antoccia, F. Ciccocanti, GM. Fimia, M. Piacentini, A. Fueyo, NL. Messina, M. Li, CJ. Chan, V. Sigl, **G. Pourcher**, V. Lazar, J. Penninger, C. López-Otín, MJ. Smyth, L. Zitvogel, M. Castedo and G. Kroemer. *An immunosurveillance mechanism controls cancer cell ploidy*. **Science** 2013 sep 28 ; 337(6102) :1678-84

- H. Tranchart, G. Di Giuro, P. Lainas, **G. Pourcher**, N. Devaquet, G. Perlemuter, D. Franco, I. Dagher. *Laparoscopic liver resections with selective prior Vascular control*. **Am J. Surg**, 2013 jan; 205 (1): 8-14

- **G. Pourcher**, G. Di Giuro, T. Lafosse, P. Lainas, S. Naveau, I. Dagher. *Routinely performed single-port sleeve gastrectomy: a single-center study of 60 patients*. **Surgery Obesity Related Diseases**, 2013 May-Jun; 9(3): 385-9

- **G. Pourcher**, C. Mazurier, Y. Y. King, M.C. Giarratana, L. Kobari, D.Boehm, L. Douay and H. Lapillonne. *Human fetal liver: an in vitro model of erythropoiesis*. **Stem Cells International**, 2011 vol. 2011: 405-429

- Tranchart H, Diop P. S, Lainas P, **Pourcher G**, Catherine L, Franco D, Dagher I. *Laparoscopic major hepatectomy can be safely performed with colorectal surgery for synchronous colorectal liver metastasis*. **HPB (Oxford)** 2011; 13: 46-50.

- Thubert T, **Pourcher G**, Deffieux X. *Small bowel volvulus following peritoneal closure using absorbable knotless device during laparoscopic sacral colpopexy*. **Int Urogynecol J**. 2011 Jun;22(6):761-3. Epub 2011 Jan 6.

Dans des revues françaises avec comité de lecture :

- C. Le Gallo, A. Zeroual, **G. Pourcher**. *Prise en charge diététique des enfants et adolescents souffrant d'obésité morbide*. **Médecine clinique endocrinologie et diabète**. Vol 70; mai-juin 2014

- **G. Pourcher**, I. Dagher. *Prise en charge chirurgicale des enfants et adolescents souffrant d'obésité morbide*. **Médecine clinique endocrinologie et diabète**. Vol 70; mai-juin 2014

- **G. Pourcher**, H. Tranchart, I. Dagher. Technique chirurgicale : *La sleeve gastrectomie par trocart unique*. **Journal de chirurgie** avril 2012
- K. Lacombe, X. Lescure, V. Martinez, **G. Pourcher**, M-A. Valantin, C. Vigouroux, J. Capeau. *Lipohypertrophies et VIH : de la physiopathologie à la prise en charge multidisciplinaire*. **Médecine et maladies infectieuses**. Avr 2012 : 42(2012) 2-11
- **G. Pourcher**, G. Perlemuter. *Stéatopathie métabolique et chirurgie bariatrique*. **Médecine clinique endocrinologie et diabète**. N°53, juillet-aout 2011.

COMMUNICATIONS

- Communication en tant qu'invité :

1. Journée de formation du club SOFFCO-jeune (Lille), 20 nov 2015 : La sleeve par trocart unique ; Prise en charge de la complication hémorragique après sleeve gastrectomie
2. First ISYLS e-congress (Montpellier) nov 2015: Monotrocart sleeve gastrectomy
3. AFC 2015 (Paris) : « Quels critères de choix entre les techniques de chirurgie bariatrique » : L'anneau – synthèse
4. SOFFCO 2015 (Lyon) session de DPC : prise en charge des complications de la sleeve gastrectomie
5. SFCE Janv 2015 (Paris) mise au point technique, vidéo session : sleeve gastrectomie par trocart unique
6. SFCE Janv 2015 (Paris) : Modérateur Situations cliniques et chirurgicales : Que faire devant ?
7. AFC (Association Française de Chirurgie) octobre 2014 (Paris) : sleeve gastrectomie par trocart unique chez le super obese
8. 14th EAES (European Association of Endoscopic Surgery) world congress Juin 2014 : Modérateur session chirurgie du biliopancréatique
9. SOFFCO (Société Française et Francophone de la Chirurgie de l'Obésité) 2014 Versailles mai 2014 : Modérateur session innovation chirurgicale
10. 19eme Journées de médecine fœtale – Morzine 2014.

- Modérateur Session maladie obésité et médecine fœtale.
 - Prise en charge de l'obésité massive en 2014
11. Journée de l'obésité pédiatrique du sud francilien mai 2014 : résultats de la prise en charge medico-chirurgicale des adolescents souffrant d'obésité massive. (G. Pourcher, JP. Defilipo)
 12. Journée de formation des équipes de la société Storz endoscopy France Juillet 2013 : La chirurgie bariatrique en 2013
 13. Bi-partite Paediatric surgery meeting: KING'S COLLEGE – Bicêtre Les 25 et 26/04/2013 (Bicêtre Hospital, Le Kremlin Bicêtre, France)
 - Présentation et Table ronde : Adolescent obesity: current status (G. Pourcher, JP Defilipo, A Desei)
 14. Curso Laparoscopia XIX (Sevilla-Spain) : 6 et 7 fev 2013
 - Vidéo transmission: Sleeve gastrectomie par trocart unique chez un super obèse en direct
 - Communication orale : Intérêt du trocart unique chez le super obèse
 15. Rencontres d'endocrinologie - Paris Sud juin 2013: Chirurgie bariatrique chez les adolescents.
 - Présentation et Table ronde : G. Pourcher, JP. Defilipo, P.Bougnieres
 16. SFCE (Société Française de Chirurgie Endoscopique) 2013 : Intérêt de l'abord en avant de l'artère mésentérique inférieure dans la pathologie diverticulaire du colon gauche. G. Pourcher et R. Abittan
 17. Session « tout sur la sleeve » organisée par la SOFFCO pour l'AFC (Association Française de Chirurgie) 2012 (Paris) : Intérêt de la sleeve gastrectomie par trocart unique
 18. Session Vidéo de la SFCE à l'AFC 2012 (Paris): sleeve gastrectomie par trocart unique

19. The OESO 2012 11th world conférence, Como (Italie) : LESS sleeve gastrectomy, French expérience
20. Session plénière d'ouverture de la SOFFCO 2012, Montpellier: Mortalité en post-opératoire de chirurgie bariatrique
21. Les Printemps de Bicêtre 2012: Prise en charge de l'obésité morbide en 2012
22. Symposium Innovations in bariatric surgery au "16eme world congres of the International Federation for Surgical Obesity and Metabolic Disorders", Hambourg, septembre 2011: LESS sleeve gastrectomy
23. Innovation chirurgicale : intérêt du trocart unique dans la chirurgie de l'obésité. Congrès national de force de vente Olympus France mai 2011

- Communications orales

1. SOFFCO 2015 (Lyon): Modifications précoces de l'insulino-sensibilité chez les adolescents opérés d'une sleeve gastrectomie. **Guillaume Pourcher**, Gianpaolo De Filippo, Naziha Khen-Dunlop, Christèle Kyheng, Pierre Bougnères
2. IFSO (International Federation of surgical obesity) aout 2014 Montréal (Canada) :
 - i. Single port Sleeve gastrectomy for superobeses
 - ii. *Endoscopic internal Drainage with Enteral Nutrition (EDEN) for treatment of leaks following sleeve gastrectomy*
3. SOFFCO mai 2014, Versailles : Drainage per-endoscopique par prothèse double queue de cochon des fistules après sleeve gastrectomie. G. Donatelli, **G. Pourcher**
4. SOFFCO mai 2014, Versailles : Prise en charge des adolescents souffrant d'obésité massive par sleeve gastrectomie par trocart unique.
G. Pourcher, JP. Defilipo, S. Ferretti, C. Picard, P. Bougnères, I Dagher.

ENSEIGNEMENT

-Donnés :

1. e-Learning (début 2015) au sein du CNU (conseil national universitaire) chirurgie viscérale : Complications de l'anneau de gastroplastie
2. Diplôme Inter-universitaire de chirurgie minimale invasive 2014-15 (Paris XI et VI) : la prise en charge des complications en chirurgie bariatrique, bypass par trocart unique, sleeve gastrectomie par trocart unique.
3. Enseignements au sein des modules endocrinologie et nutrition Faculté de Médecine Paris Sud: Obésité de l'adulte et de l'enfant (1h) et traitement de l'obésité morbide (1h30). Depuis 2012-2013
4. Diplôme Inter-universitaire coelioscopie avancée (Faculté Paris XI) depuis 2009 avec animation, bloc en direct et cours:
 - a. Une journée de Vidéotransmission (sleeve gastrectomie par trocart unique).
 - b. Session chirurgie bariatrique : Les indications de prise en charge en chirurgie bariatrique (1h), la gastrectomie verticale calibrée par trocart unique (1h), prise en charge des complications de la Sleeve gastrectomie (1h).
 - c. Prise en charge des diverticulites sigmoïdiennes (1h).
5. Diplôme Universitaire, cancer et grossesse, Pr Fernandez (Faculté Paris XI): Les cancers digestifs et grossesse (1h) Depuis 2009
6. Cours pour les DCEM3, Faculté de médecine Paris XI: Anatomie clinique des voies biliaires et de la pathologie herniaire (3h/an). Depuis 2008

SOCIETES-ASSOCIATIONS

- Membre du conseil d'administration de la SOFFCO (Société française et francophone de chirurgie de l'obésité) depuis 2015
- Vice Président fondateur du Club SOFFCO JEUNE crée en 2014

- Président de l'Equipe de Liaison Alimentation Nutrition de l'Hôpital Bécclère depuis 2014
- Membre du Comité de Liaison Alimentation Nutrition (CLAN) central groupe cancerologie nutrition depuis 2014
- Membre du CLAN du Groupe hospitalier Paris Sud depuis 2012
- Vice Président du Conseil d'administration de GPM 92 (Groupement Pasteur Mutualité) depuis Dec 2013
- Membre élu du conseil d'administration de la Société Française de Chirurgie Endoscopique (SFCE) depuis Mars 2012
- Membre de la SOFFCO (Société française et francophone de chirurgie de l'obésité) depuis juin 2009
- Trésorier de l'ARCHE (Association pour la Recherche en Chirurgie Hépatique et Endoscopique) et Membre fondateur depuis 2009
- Rédacteur en chef et fondateur de « Avenir Médecin » (journal national des jeunes médecins): 2005 - 2008
- Secrétaire général adjoint du Conseil National de Chirurgie (CNC), 2005-2007
- Premier Vice-Président de l'InterSyndicat National des Internes des Hôpitaux (ISNIH), 2005-2007
- Membre du conseil national de chirurgie, 2004-2008
- Membre du conseil d'administration de l'Union des Chirurgiens de France (UDCF), 2005-2008

ACTIVITE DE RECHERCHE

- **Investigateur Chirurgie du protocole de recherche clinique ObéVIH :** Etude physiopathologique du tissu adipeux des patients infectés par le VIH, souffrant d'obésité massive et opérés d'une sleeve gastrectomie par trocart unique
CPP déposé en Oct 2015 – Promoteur: Centre de Recherches et d'Etudes de la Pathologie Tropicale et du Sida (CREPATS) ; Hôpital de la Pitié-Salpêtrière : 91, boulevard de l'Hôpital, 75 013 PARIS FRANCE
- **Investigateur coordinateur principal du PHRC multicentrique national MINIOB**
accepté en 2014: Evaluation multicentrique d'une technique de chirurgie bariatrique

minimale invasive utilisant le trocart unique coelioscopique (incision de 2.5cm) au mieux de 4 à 7 trocars dans la sleeve gastrectomie ou gastrectomie longitudinale.

- Amélioration des résultats de la thérapie cellulaire hépatique dans des modèles précliniques, 6^{ème} année de thèse (diplôme de Doctorat en sciences). Equipe INSERM U 972 - Les cellules souches: de leurs niches aux applications thérapeutiques. Directeurs de thèse : Pr I. Dagher et Dr A. Dubart Kupperschmitt.
- Travail collaboratif depuis 2014: Thérapie cellulaire/génique chez le macaque CEA/MIRCEN équipe du Pr P. Bougnères dans le cadre transplantation surrénalienne (déficit en 21 hydroxylase)
- Travail collaboratif : Thérapie cellulaire/génique chez le macaque nouveau-né : Transplantation autologue, Cellules Souches Hématopoïétiques, Sang de cordon (placentaire), Transduction lentivirale. Equipe INSERM U 972 - Les cellules souches : de leurs niches aux applications thérapeutiques Dr A. Dubart Kupperschmitt
- Participation dans l'équipe du Pr Douay à Hôpital St Antoine – Paris : « Différenciation Hémato-Angioblastique des Cellules Souches Embryonnaires Humaines. Application thérapeutique en hématologie/transfusion et réparation vasculaire des lésions radio-induites »
- **Investigateur sur l'hôpital Antoine Béchère depuis 2010 de l'étude clinique PRODIG 7:** « Essai de phase III évaluant la place de la chimiohyperthermie intrapéritonéale per opératoire (CHIP) après résection maximale d'une carcinose péritonéale d'origine colorectale associée à une chimiothérapie systémique. »
- **Investigateur sur l'hôpital Antoine Béchère de l'étude DESKTOP III,** étude européenne de phase III évaluant l'intérêt de la chimiothérapie seule vs chirurgie maximaliste et chimiothérapie en cas de récurrence à plus 6 mois du cancer de l'ovaire

LANGUES

- **Français** : lu, parlé, écrit (langue maternelle)
- **Anglais** : lu, parlé, écrit
- **Espagnol** : lu, parlé

RELECTEUR POUR DES REVUES PUB MED

Journal of Surgery

Journal of Visceral Surgery

Annexe 2: Résumés grand public en français et en anglais

Résumé grand public :

La transplantation de cellules hépatiques dans le foie a pour but de corriger sa fonction et éviter la transplantation d'organe. Mais les résultats montrent une prise de greffe insuffisante et un effet thérapeutique transitoire.

Nous avons proposé une nouvelle approche de stimulation de la régénération hépatique chez la souris en utilisant une embolisation portale volumétrique à l'aide de microbilles allant très loin dans tout le foie sans altération anatomique. Par ailleurs de nouvelles cellules plus performantes ont été évaluées: les cellules souche mésenchymateuses hépatiques d'origine foetale. Avant de passer sur des modèles cliniques, une évaluation de l'embolisation volumétrique sur un animal plus gros (rat ou macaque) avec déficit métabolique est nécessaire. De réels progrès dans la thérapie cellulaire hépatique devront permettre dans le futur de mieux traiter les patients atteints de maladies métaboliques héréditaires.

Short Abstract :

Hepatocyte transplantation has been proposed as an alternative to orthotopic liver transplantation to treat metabolic liver diseases. This approach requires preconditioning of the host liver to enhance engraftment of transplanted hepatocytes. Different methods are currently used in preclinical models: partial hepatectomy, portal ligation or embolization, and radiotherapy or chemotherapeutic drugs. These methods carry high risks of complications and are problematic for use in clinical practice. Here, we developed an innovative method called volumetric portal embolization (EPV), which preserves total liver volume. We study the volumetric embolization conditions, the best condition, resulted in the regeneration of 5% of total liver. In these conditions, transplanted hepatocytes engraftment was significantly higher than in control conditions (3 vs 0.65%). EPV is a new, minimally invasive and efficient technique to prepare the host liver for cell transplantation.